



MASTERARBEIT

Frau B. Sc.
Nora Heinig

**Einfluss des Verhältnisses
von Prototype Foamy Virus
(PFV) Kapsid- und Enzym-
komponenten auf die
Infektiosität von PFV Partikeln**

Dresden, 2012

MASTERARBEIT

Einfluss des Verhältnisses von Prototype Foamy Virus (PFV) Kapsid- und Enzym- komponenten auf die Infektiosität von PFV Partikeln

Autor:

Frau B. Sc.

Nora Heinig

Studiengang:

Molekularbiologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

MO10w1-M

Erstprüfer:

Prof. Dr. Petra Radehaus

Zweitprüfer:

Prof. Dr. Dirk Lindemann

Einreichung:

Mittweida, 28.09.2012

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2012

MASTER THESIS

Influence of the ratio of Prototype Foamy Virus (PFV) capsid and enzyme components on the virion infectivity

author:

Ms. B. Sc.

Nora Heinig

course of studies:

Molecularbiology/Bioinformatics

seminar group:

MO10w1-M

first examiner:

Prof. Dr. Petra Radehaus

second examiner:

Prof. Dr. Dirk Lindemann

submission:

Mittweida, 28.09.2012

defence/ evaluation:

Mittweida, 2012

Bibliografische Beschreibung:

Heinig, Nora:

Einfluss des Verhältnisses von Prototype Foamy Virus (PFV) Kapsid- und Enzymkomponenten auf die Infektiosität von PFV Partikeln. - 2012. - XVI, 86 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik
Masterarbeit, 2012

Referat:

Der Replikationszyklus der Foamyviren zeichnet sich durch zahlreiche Besonderheiten aus. Dazu zählt die reverse Transkription des viralen RNA-Genoms zu einem späten Zeitpunkt im Replikationszyklus, die in einem infektiösen Genom resultiert. Neueste Beobachtungen lassen vermuten, dass die Protease-vermittelte Prozessierung des Kapsid-Proteins die Aktivität der Reversen Transkriptase (RT) initiiert (Hütter et al., unveröffentlicht). Virale Partikel, die nur aus prozessiertem p68^{Gag} bestehen, weisen eine verminderte Infektiosität auf, was mit einem geringeren intrapartikulären DNA-Gehalt korreliert. Das Fehlen des p3^{Gag}-Proteins in diesem Ansatz ließ eine stimulierende Wirkung des Proteins auf die RT-Aktivität vermuten. Das Ziel der Arbeit bestand in der Untersuchung des Einflusses des p3^{Gag}-Proteins auf die Infektiosität gebildeter Viruspartikel.

ABSTRACT

The retroviral enzymes play key roles in the productive viral replication cycle. Foamy Viruses (FV) are unique among retroviruses in performing genome reverse transcription late in replication resulting in an infectious DNA genome. Recently Hütter et al. observed that enzymatic viral protease (PR) activity is not strictly essential during Prototype FV (PFV) entry processes (Hütter et al., unpublished). PR-deficient enzyme (Pol)-packaging constructs allowed the generation of infectious, viral DNA-containing particles, if they were combined with the larger processing product (p68^{Gag}) of the capsid (Gag) precursor protein. These results suggest that viral PR-mediated Gag-precursor processing is an initiation step for intraparticular reverse transcription upon particle assembly. However, PFV p68^{Gag} expression constructs in combination with PR-active Pol-packaging constructs yielded 10-fold reduced relative infectivity in comparison to respective p71^{Gag}-derived particles. The virion infectivity correlated well with reduced virion associated DNA amounts suggesting a defect in reverse transcription. Therefore the mature Gag p3 domain might be a cofactor for RT enzymatic activity, which could explain the reduced infectivity of FV particles composed of only p68^{Gag}. The aim of this thesis was to characterize the effect of p3^{Gag} on infectivity. The results demonstrate that p3^{Gag} indeed might have a stimulatory effect on RT activity, because the infectious titer increased, if different FV vector systems are combined with p3^{Gag} *in trans*.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dirk Lindemann möchte ich ganz herzlich für die Möglichkeit des Schreibens der Masterarbeit am Institut der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus und für die diesbezügliche nette Betreuung sowie die wissenschaftliche Hilfestellung und zahlreichen Ratschlägen und Diskussionen danken.

Bei Frau Prof. Dr. Petra Radehaus möchte ich mich für die Betreuung seitens der Hochschule vielmals bedanken.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Lindemann bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Belangen der Laborarbeit und die gute Atmosphäre im Labor. Ein besonderer Dank gilt Sylvia Hütter für die stets kompetente und freundliche Betreuung und das Korrekturlesen der Arbeit.

Letztlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht, die Rücksichtnahme sowie die ermutigenden und auch beruhigenden Worte.

INHALTSVERZEICHNIS

Abstract	VI
Danksagung.....	VII
Inhaltsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abbildungsverzeichnis.....	XII
Abkürzungsverzeichnis.....	XIV
1. Einleitung.....	1
1.1 Retroviren	1
1.2 Foamyviren	2
1.2.1 Charakterisierung und Vorkommen	2
1.2.2 Partikelmorphologie.....	3
1.2.3 Genomorganisation	4
1.2.4 Expression und Funktion foamyviraler Proteine	6
1.2.5 Replikationszyklus.....	11
1.2.6 Foamyvirale Vektorsysteme.....	13
1.3 Zielsetzung	15
2. Material	17
2.1 Antibiotika	17
2.2 Antikörper	17
2.3 Bakterienstämme	18
2.4 Enzyme.....	18
2.5 Größenmarker.....	18
2.6 Chemikalien	19
2.7 Lösungen und Puffer	19
2.8 Medien.....	22
2.8.1 Bakterienkulturmedien.....	22
2.8.2 Zellkulturmedien.....	22
2.9 Oligonukleotide	23
2.10 Plasmide.....	23
2.11 Weitere Materialien und kommerzielle Testsysteme	26
2.12 Zelllinien	26

3. Methoden	27
3.1 Molekularbiologische Methoden	27
3.1.1 Kultivierung von Bakterien	27
3.1.2 Plasmidextraktion aus <i>E. coli</i> mittels alkalischer Lyse	27
3.1.3 DNA-Klonierung	28
3.1.4 DNA Analyse	31
3.2 Proteinanalytische Methoden	32
3.2.1 Tricine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
3.2.2 Semi-dry Western Blot.....	33
3.2.3 Immunologischer Nachweis	33
3.2.4 Quenchen von Western Blot Membranen	34
3.3 Zellbiologische Methoden	34
3.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	34
3.3.2 Transfektion von 293T Zellen mit Polyethylenimin	35
3.3.3 Herstellung von Zelllysaten	36
3.3.4 Durchflusszytometrie	36
3.4 Virologische Methoden	37
3.4.1 Partikelpräparation aus Zellkulturüberständen	37
3.4.2 Infektion von Wirtszellen.....	38
4. Ergebnisse.....	39
4.1 Klonierung eines HA- bzw. eGFP-getaggten PFV Gag p3 Expressionskonstruktes	39
4.2 Biochemische Charakterisierung der zellulären Proteinexpression und Infektionsanalyse der freigesetzten Partikel basierend auf Koexpression des PFV Gag p3HA- bzw. p3GFP-Fusionskonstrukte im PFV 4-Komponenten-Vektorsystem.....	40
4.2.1 Wildtypisches 4-Komponenten-Vektorsystem	43
4.2.2 Modifiziertes p68 ^{Gag} -4-Komponenten-Vektorsystem	47
4.2.3 Modifiziertes iPR-4-Komponenten-Vektorsystem	50
4.2.4 Modifiziertes p68 ^{Gag} -iPR-4-Komponenten-Vektorsystem	51
4.2.5 Übersicht zur Infektionsanalyse der generierten viralen Partikel basierend auf Koexpression des p3HA-Fusionskonstruktes im 4-Komponenten-Vektorsystem	55
4.3 Biochemische Analyse der zellulären Expression bzw. Partikelassoziation der p3 ^{Gag} HA- und p3 ^{Gag} eGFP- Fusionsproteine	58
4.4 Biochemische Charakterisierung der zellulären Proteinexpression und Infektionsanalyse der freigesetzten Partikel basierend auf Koexpression des p3HA- Fusionskonstruktes im proviralen System.....	63
4.4.1 Wildtypisches provirales System (pczHSRV2EM26)	64
4.4.2 Modifiziertes provirales System (pczHSRV2 p68st iPR)	66

4.5 Einfluss der Koexpression des p68 ^{Gag} -Konstruktes im proviralen System.....	67
4.5.1 Modifiziertes provirales System (pczHSRV2 p68st iPR)	67
4.5.2 Wildtypisches provirales System (pczHSRV2EM26)	67
5. Diskussion	71
6. Zusammenfassung	78
7. Literaturverzeichnis.....	80
Eidesstattliche Erklärung	86

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1 Taxonomie der <i>Retroviridae</i> (nach ICTV, 2009).....	1
Tabelle 2.1 Verwendete Antibiotika	17
Tabelle 2.2 Verwendete Antikörper.....	17
Tabelle 2.3 Verwendete <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	18
Tabelle 2.4 Verwendete Enzyme.....	18
Tabelle 2.5 Verwendete Größenstandards.....	18
Tabelle 2.6 Verwendete Oligonukleotide.....	23
Tabelle 2.7 Verwendete Plasmide	23
Tabelle 2.8 Hergestellte Plasmide	25
Tabelle 2.9 Verwendete kommerzielle Kits und weitere Materialien	26
Tabelle 2.10 Verwendete Zelllinien	26
Tabelle 3.1 PCR-Reaktionsansatz.....	29
Tabelle 3.2 PCR-Reaktionsbedingungen	29
Tabelle 3.3 Ansätze Restriktionsverdau	30
Tabelle 3.4 Zusammensetzung Tricine SDS-Polyacrylamidgele.....	33
Tabelle 3.5 PEI-Transfektionsmix.....	35
Tabelle 3.6 Ansatz Ultrazentrifugation	37
Tabelle 3.7 Ansatz Subtilisinverdau	38
Tabelle 4.1 Klonierungsstrategien der PFV p3 ^{Gag} -Fusionskonstrukte pcoPGp3 CHA und pcoPGp3 CeGFP	40
Tabelle 4.2 Verwendete Plasmide des expressionsoptimierten PFV 4-Komponenten-Vektorsystems	41
Tabelle 4.3 Verhältnis der verwendeten Plasmide des PFV 4-Komponenten-Vektorsystems zu den kotransfizierten Konstrukten für Infektions- und biochemische Analysen.....	42
Tabelle 4.4 Vergleich der relativen Infektiosität der im kotransfizierten PFV wt-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3HA-Konstrukten entstandenen Viruspartikel.....	47
Tabelle 4.5 Vergleich der relativen Infektiosität der im kotransfizierten p68-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3 ^{Gag} -Konstrukten entstandenen Viruspartikel	50
Tabelle 4.6 Vergleich der relativen Infektiosität der im kotransfizierten p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3 ^{Gag} -Konstrukten entstandenen Viruspartikel	54
Tabelle 4.7 Vergleich der relativen Infektiosität der in 4-Komponenten-Vektorsystemen mit p3 ^{Gag} -Konstrukten entstandenen Viruspartikel	57

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1	Zytopathischer Effekt (Rethwilm, 2010).....	3
Abbildung 1.2	Darstellung der Morphologie foamyviraler Partikel	4
Abbildung 1.3	Genomorganisation und Genexpression der FV (Lindemann und Rethwilm, 2011).....	5
Abbildung 1.4	Schematische Darstellung des PFV Gag-Vorläuferproteins (Lindemann und Rethwilm, 2011).....	7
Abbildung 1.5	Schematische Darstellung des PFV Pol-Vorläuferproteins (Lindemann und Rethwilm, 2011).....	8
Abbildung 1.6	Schematische Darstellung des PFV Env-Vorläuferproteins (Lindemann und Rethwilm, 2011)	10
Abbildung 1.7	Schematische Darstellung des PFV-Replikationszyklus (verändert nach Lindemann und Rethwilm, 2011)	13
Abbildung 1.8	PFV 4-Komponenten-Vektorsystem (Lindemann und Rethwilm, 2011) ...	14
Abbildung 1.9	Proviraies Konstrukt am Beispiel von pczHSRV2 wt (verändert nach Lehmann-Che et al., 2005).....	15
Abbildung 4.1	Schematische Darstellung der PFV p3 ^{Gag} -Fusionskonstrukte	39
Abbildung 4.2	Biochemische Analyse der zellulären Proteinexpression basierend auf der Kotransfektion des PFV 4-Komponenten-Vektorsystems mit dem p3HA-Fusionskonstrukt in 293T Zellen	45
Abbildung 4.3	Relative Infektiosität der aus dem wt-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3HA-Konstrukten entstandenen Viruspartikel	46
Abbildung 4.4	Biochemische Analyse der zellulären Proteinexpression basierend auf der Kotransfektion des PFV p68-4-Komponenten-Vektorsystems mit dem p3 ^{Gag} -Fusionskonstrukt in 293T Zellen	48
Abbildung 4.5	Relative Infektiosität der aus dem p68-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3 ^{Gag} -Konstrukten entstandenen Viruspartikel	50
Abbildung 4.6	Biochemische Analyse der zellulären Proteinexpression basierend auf der Kotransfektion des PFV p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystems mit dem p3 ^{Gag} -Fusionskonstrukt in 293T Zellen	52
Abbildung 4.7	Relative Infektiosität der aus dem p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3 ^{Gag} -Konstrukten entstandenen Viruspartikel.....	54
Abbildung 4.8	Relative Infektiosität der aus dem 4-Komponenten-Vektorsystem mit p3HA-Konstrukten entstandenen Viruspartikel	57
Abbildung 4.9	Biochemische Analyse der zellulären p3 ^{Gag} eGFP-Proteinexpression und Partikelassoziation	61
Abbildung 4.10	Biochemische Analyse der Partikelassoziation von p3 ^{Gag} eGFP-Proteinen nach Subtilisinverdau	63

Abbildung 4.11 Biochemische Analyse der zellulären Proteinexpression basierend auf der Kotransfektion des proviralen Konstruktes pczHSRV2EM26 mit dem p3HA-Expressions-konstrukt in 293T Zellen.....	65
Abbildung 4.12 Relative Infektiosität der aus dem wt proviralen System mit p3HA-Konstrukten entstandenen Viruspartikel	66
Abbildung 4.13 Biochemische Analyse der zellulären Proteinexpression basierend auf der Kotransfektion des proviralen Expressionskonstruktes pczHSRV2EM26 mit dem p68 ^{Gag} -Expressionskonstrukt in 293T Zellen.....	69
Abbildung 4.14 Relative Infektiosität der aus dem wt proviralen System mit p68 ^{Gag} -Konstrukten entstandenen Viruspartikel	70

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Anti-
A-Domäne	„assembly“ Domäne
AK	Antikörper
Amp ^R	Ampizillinresistenz
APOVEC3	apolipoprotein B mRNA editing catalytic subunit 3
Aqua dest.	destilliertes Wasser
As	Aminosäure
BFV	Bovine Foamy Virus
bGH	engl. bovine growth hormone
bp	Basenpaar
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
CA	retrovirales Kapsidprotein
Cap	7' Methylguanin-Kappenstruktur
CAS	<i>cis</i> -aktive Sequenz
CBS	engl. chromatin binding signal
CC	coiled-coil
CMV	konstitutiver Promotor des Cytomegalie Virus, engl. cytomegalovirus immediate-early promotor
CTRS	engl. cytoplasmic targeting and retention signal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFV	Equine Foamy Virus
eGFP	engl. enhanced green fluorescent protein
engl.	englisch
Env	virale Glykoproteine, engl. envelope
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT-I	engl. endosomal sorting complex required for transport I
FACS	Durchflusszytometrie, engl. fluorescence activated cell sorting
FFU	foci forming units
FFV	Feline Foamy Virus
FP	Fusionsprotein
FuP	Fusionspeptid
FV	Foamy Virus
Gag	gruppenspezifisches Antigen, virales Genprodukt

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GR-Box	Glycin-Arginin reiche Sequenzen
h	hydrophobe Domäne oder Stunde
HA	Hämagglutinin
HFV	humanes Foamy Virus
HIV	humanes Immundefizienzvirus
His	Histidin
HRP	engl. horseradish peroxidase
HTLV	humanes T-Lymphotropes Virus
IN	Integrase
IP	interner Promotor
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L-Domäne	“late” Domäne
LC8	engl. light chain 8
LP	Leaderpeptid
LTR	Lange Wiederholungssequenz, engl. long terminal repeat
MA	retrovirales Matrixprotein
mRNA	messenger RNA
MSC	engl. multiple cloning site
MSD	membranspannende Domäne
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum, engl. microtubule organizing center
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
NC	retrovirales Nukleokapsidprotein
NLS	nukleäres Kernimportsingnal, engl. nuclear localization signal
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen, engl. open reading frame
p	Protein
p3	p3 ^{Gag} , virales Protein
p68	p68 ^{Gag} , virales Protein
p71	p71 ^{Gag} , virales Protein
pA	Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Primerbindestelle oder Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFV	Prototyp Foamy Virus
PIK	Präintegrationskomplex

Pol	Polymerase, virale Genprodukte mit enzymatischer Aktivität
PP	Partikelpräparation
PPT	Polypurintrakt
PR	Protease
Quenchen	löschen, engl. quench
R-Region	redundante Region
RBD	Rezeptorbindungsdomäne
RH	RNase H
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SFFV	engl. spleen focus forming virus
SFVmac	Macaque Simian Foamy Virus“
SIN	engl. self inacting
SU	Oberflächenuntereinheit
T _a	Primerspezifische Annealingtemperatur
Tag	Proteinmarkierung, engl. tag
Tas	virales Protein, engl. transactivator of spumaviruses
T _m	Schmelzpunkt des Primers
TM	Transmembranuntereinheit
U-Region	unique Region
Ub	Ubiquitin
VLP	virusähnliche Partikel, engl. virus-like particle
wt	Wildtyp
Zeo ^R	Zeozinresistenz
ZL	Zelllysat

1. EINLEITUNG

1.1 Retroviren

Die Namensgebung der Retroviren, abgeleitet von Reverse Transkriptase Onkoviren, bezieht sich auf die Entdeckung der viralen Polymerase Reverse Transkriptase (RT). Das Schlüsselenzym der Retroviren wurde erstmals 1970 von Baltimore und Temin beschrieben (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970). Die Eigenschaft der RT RNA in DNA umzuschreiben, stieß das bis dahin allgemeingültige Dogma des genetischen Informationsflusses von DNA über RNA zur Aminosäuresequenz um. Die Transkription der viralen RNA in DNA während des retroviralen Replikationszyklus ermöglicht die stabile Integration in das Genom einer infizierten Wirtszelle.

Aufgrund unterschiedlicher Erkrankungsformen und charakteristischer morphologischer und genetischer Eigenschaften erfolgt die taxonomische Einteilung der Retroviren in zwei Unterfamilien und sieben Gattungen (Modrow et al., 2010). Eine Klassifizierungsübersicht bietet Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1 Taxonomie der *Retroviridae* (nach ICTV, 2009)

Unterfamilie	Gattung	Genom	Beispiel(e)
<i>Orthoretrovirinae</i>	Alpharetrovirus	einfach	Avian Leukosis Virus Fujinami Sarcoma Virus
	Betaretrovirus	einfach	Mouse Mammary Tumor Virus
	Deltaretrovirus	komplex	Bovine Leukemia Virus
	Epsilonretrovirus	komplex	Walleye Dermal Sarcoma Virus
	Gammaretrovirus	einfach	Murine Leukemia Virus Feline Leukemia Virus
	Lentivirus	komplex	Human Immunodeficiency Virus (HIV)
<i>Spumaretrovirinae</i>	Spumavirus/ Foamyvirus	komplex	Prototype Foamy Virus (PFV) Equine Foamy Virus (EFV)

Retroviren sind im Allgemeinen Einzel(+)-Strang-RNA-Viren mit umhülltem Viruspartikel, einer Genomlänge von 7-12 kb und einer Größe von 80-140 nm (Coffin et al., 1997; Modrow et al., 2003). Alle Vertreter kodieren die Proteine Gag (gruppenspezifisches Antigen), Pol (Polymerase) und Env (Hülle, engl. envelope). Weiterhin werden die Retroviren aufgrund ihrer Genomorganisation in einfache und komplexe Retroviren unterteilt. Komplexe Retroviren verfügen neben den Strukturproteinen zusätzlich über akzessorische Proteine mit regulatorischen Funktionen (Vogt, 1997). Die Foamyviren (FV) gehören ebenso zu

den Retroviren mit komplexem Genom.

Die erste menschliche Erkrankung wurde mit der Entdeckung des Human T-Zell Leukämievirus (HTLV) und dessen onkogenem Potenzial beschrieben (Poiesz et al., 1980). Generell können Retroviren eine onkogene Wirkung entfalten, indem über das virale Genom direkt Onkogene integriert werden oder infolge der Aktivierung oder Deaktivierung von Zellregulatorproteinen mit dem viralen Promotor (Levinson et al., 1978; Modrow et al., 2003; Modrow et al., 2010).

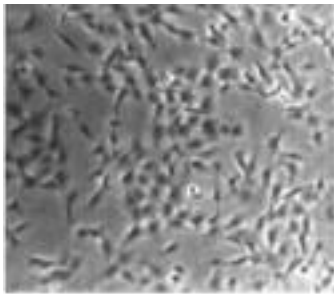
1.2 Foamyviren

1.2.1 Charakterisierung und Vorkommen

Die Foamyviren werden in die Familie der Retroviren, Unterfamilie *Spumaretrovirinae*, eingeordnet (Tabelle 1.1). Sie nehmen in der Familie der *Retroviridae* eine gesonderte Stellung aufgrund eines divergenten Replikationszyklus und anderen charakteristischen Merkmalen ein.

Enders und Peebles beschrieben im Jahre 1954 erstmals das Auftreten von Foamyviren an Nierenzellkulturen von Rhesusaffen (Enders und Peebles, 1954). In den folgenden Jahren konnten FV aus Rindern (Bovine Foamy Virus, BFV), Katzen (Feline Foamy Virus, FFV) und Pferden (Equine Foamy Virus, EFV) isoliert werden (Boothe et al., 1970; Riggs et al., 1969; Tobaly-Tapiero et al., 2000). 1971 gelang schließlich die Isolation aus menschlichen Zellen. Die als humane Foamyviren (HFV) bezeichneten Viren stammten aus Nasopharynxkarzinomgewebe eines Kenianers (Achong et al., 1971). 1994 stellte sich infolge einer Sequenzanalyse jedoch heraus, dass es sich bei dem HFV-Isolat wahrscheinlich um ein zoonotisch, auf den Menschen übertragenes Schimpansenvirus handelte (Herchenröder et al., 1994). Mittlerweile ist bekannt, dass der Mensch kein natürlicher Wirt ist (Flügel, 1991; Linial, 2000). Die Bezeichnung HFV wurde deshalb durch Prototype Foamy Virus (PFV) oder Simian Foamy Virus from Chimpanzees (SFVcpz (hu)) ersetzt. Ihren Namen erhielten die Foamyviren aufgrund ihres zytopathischen Effektes in Zellkulturen. Das beschriebene schaumartige Aussehen (engl. foam, lateinisch spuma, Schaum) entsteht durch Bildung großer, vielkerniger Synzytien. Interessanterweise gelten FV im Gegensatz zu vielen anderen Retroviren als apathogen, da bisher weder human- noch zoopathogene Eigenschaften bekannt sind. FV etablieren in ihren natürlichen Wirten persistierende und latente Infektionen mit hohen Antikörpertitern (Meiering und Linial, 2001). Sie sind in der Lage, eine Vielzahl von Zelltypen zu infizieren. Innerhalb der Vertebraten sind *in vitro* nahezu alle Zelllinien mit FV infizierbar (Hill et al., 1999). 2010 konnten eine Zebrafisch und eine humane embryonale Erythrozyten-Vorläufer-Zelllinie nachgewiesen werden, die nicht infizierbar sind (Stirnagel et al., 2010).

nicht infizierte Zellen



infizierte Zellen

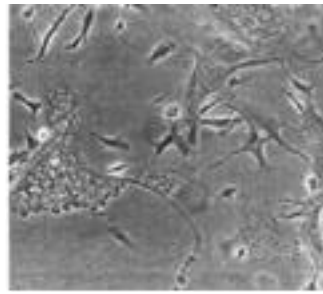


Abbildung 1.1 Zytopathischer Effekt (Rethwilm, 2010)

Lichtmikroskopische Aufnahme nicht infizierter humaner Fibroblasten und mit PFV infizierter humaner Fibroblasten, die die Bildung vielkerniger Riesenzellen zeigen.

1.2.2 Partikelmorphologie

FV Partikel weisen einen Partikeldurchmesser von ca. 100-140 nm in Form eines sphärischen Ikosaeders auf. Das Virion ist von einer äußeren Hüllmembran, die aus einer Doppellipidschicht besteht, umgeben. Darin eingelagert sind virale Glykoproteine und zelluläre Proteine (Modrow et al., 2010). Die viralen Glykoproteine werden als Env-Proteine bezeichnet und liegen als Trimere, verankert in der Lipidmembran vor. Jedes einzelne Env-Monomer besteht aus einer Leaderpeptid (LP)-, Oberflächen (SU)- und Transmembran (TM)-Untereinheit (Lindemann et al., 2001; Morozov et al., 1997; Wilk et al., 2000). Über das Env-Hüllprotein erfolgt die Erkennung und Bindung des Virus an den entsprechenden, bislang unbekannten Rezeptor, auf der Zielzelle. Die Membranhülle umschließt ein Kapsid, welches aus Gag-Vorläuferproteinen ($p71^{\text{Gag}}$) und prozessierten Gag-Spaltprodukten ($p68^{\text{Gag}}$) aufgebaut ist. Das 50-60 nm große Kapsid umgibt das virale Genom und die viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT), RNaseH (RH) und Integrase (IN).

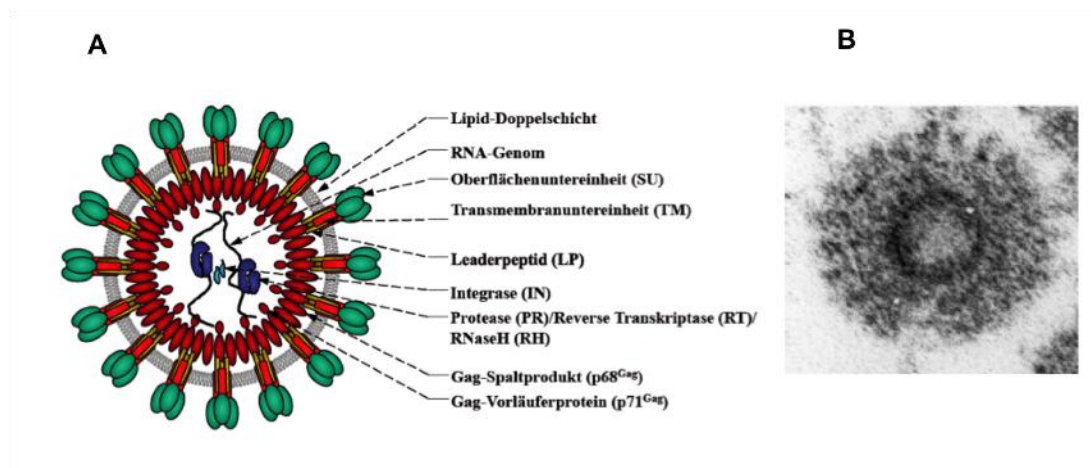


Abbildung 1.2 Darstellung der Morphologie foamyviraler Partikel

A) Schematischer Aufbau eines FV Partikels (verändert nach Lindemann und Rethwilm, 2011)

B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines FV Partikels (Lindemann und Zentgraf, unveröffentlicht)

Das Hüllprotein besteht aus Oberflächenuntereinheiten (SU), Transmembranuntereinheit (TM) und Partikel-assoziiertem Leaderpeptid (LP). Im Inneren befinden sich das Kapsid, zusammengesetzt aus p71^{Gag}- und p68^{Gag}-Proteinen, das virale Genom, die viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT), RNaseH (RH) und Integrase (IN).

Extrazelluläre FV Partikel enthalten 10-15 % dsDNA, wohingegen andere Vertreter der *Orthoretrovirinae* mit 0,001 % einen deutlich geringeren Anteil dsDNA enthalten (Roy et al., 2003; Yu et al., 1999). Diese Besonderheit der Foamyviren liegt darin begründet, dass die reverse Transkription während der Partikelmorphogenese stattfindet und die Umschreibung vor der Partikelfreisetzung zum Großteil abgeschlossen ist. Andere Retroviren, beispielsweise HIV, setzen unreife Partikel frei, denen die Transkription noch bevorsteht (Mannigel et al., 2007; Moebes et al., 1997; Yu et al., 1999).

1.2.3 Genomorganisation

Eingelagert in das Kapsid, liegt das virale Genom in doppelter Ausführung vor. Das RNA-Genom weist bei einer Länge von 11,68 kb die für Retroviren typischen Elemente auf. Die Genome enthalten eine Dimerisierungsdomäne in der 5' gelegenen Leader-Region, über welche sie miteinander assoziiert sind (Erlwein et al., 1997). Die foamyvirale genomische RNA enthält die *cis*-aktiven Elemente (CAS, engl. *cis*-acting sequences) I und II, die eine Rolle für die Verpackung des viralen RNA-Genoms und der Pol-Proteine spielen. Zudem befinden sich auf der RNA Sequenzabschnitte die notwendig für die reverse Transkription sind. Dazu zählen die *cis*-aktiven Sequenzelemente, die Primerbindestelle (PBS), an die eine zelluläre tRNA^{Lys} binden kann und der Polypurintrakt (PPT). Neben der PBS enthält der 5' nicht translatierte Bereich ferner ein Verpackungssignal (Ψ) zur Verpackung der viralen RNA in das Kapsid (Linial, 1999). Ein weiteres Verpackungssignal beinhaltet CAS II, das sich in der Region des *pol*-ORF (offener Leserahmen, engl. open reading frame)

befindet (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Wiktorowicz et al., 2009).

Nach der reversen Transkription hat das Provirusgenom eine Länge von 13,26 kb und enthält neben den ORFs *gag*, *pol* und *env* für die Strukturproteine zwei weitere ORFs, die für die akzessorischen Proteine Tas (*tas*-ORF) und Bet (*orf-2*-ORF) kodieren (Herchenröder et al., 1994; Lecellier und Saib, 2000). Flankiert sind die kodierenden Bereiche von zwei langen Wiederholungssequenzen (LTR, engl. long terminal repeat), die aus den Regionen U3/R/U5 aufgebaut sind. Die U-Regionen (engl. unique) vermitteln die IN-gesteuerte Integration der proviralen DNA ins Wirtszellgenom. Zudem beinhaltet die U3-Region des 5' LTR den Promotor und *cis*-aktive Elemente zur Steuerung der Expression viraler Strukturgene (Linial, 1999; Modrow et al., 2003). Für Foamyviren charakteristisch ist die Existenz eines zweiten Promotors, dem so genannten internen Promotor (IP), der sich in der Region des *env*-ORFs befindet und die Expression der akzessorischen Proteine reguliert (Löchelt et al., 1993).

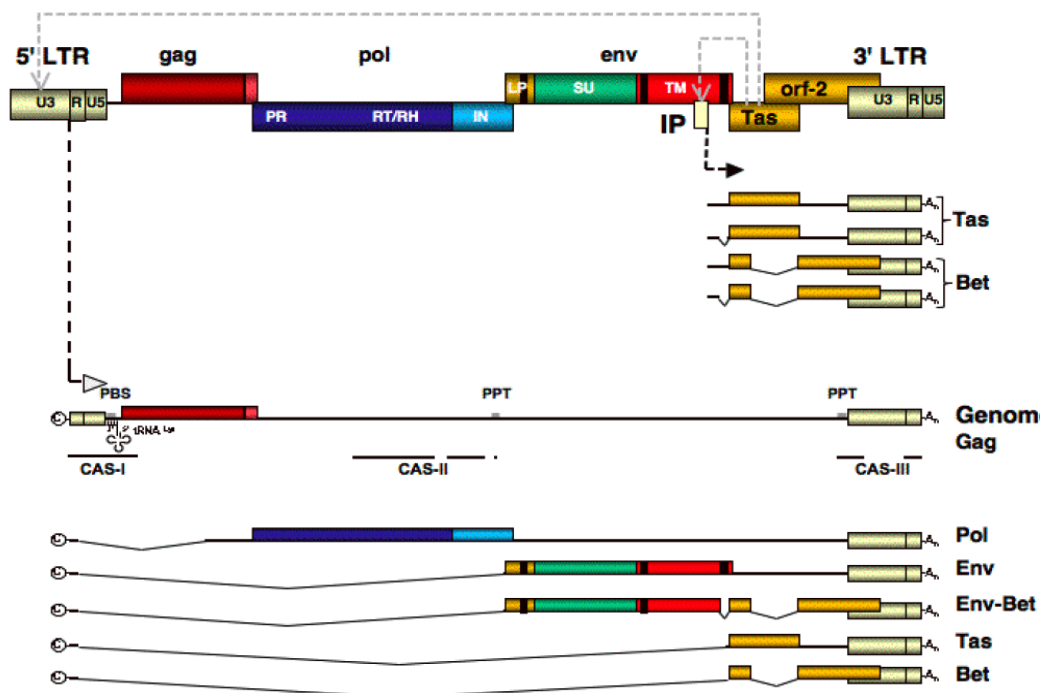


Abbildung 1.3 Genomorganisation und Genexpression der FV (Lindemann und Rethwilm, 2011)

Schematische Darstellung des FV proviralen Genoms (oben), die genomische (mittig) und subgenomische (unten) mRNAs. 5' Cap - 7'-Methylguanosin-Kappenstruktur, Am 3' Ende: Polyadenylierungssignal, PBS - Primerbindestelle, Ψ - 5' RNA-Verpackungssignal, PPT - Polypurintrakt, CAS I-III - *cis*-aktive Sequenzen I-III, U5/U3 - unique 5'- bzw. 3'-Region, R - redundante Region, LTR - long terminal repeat, PR - Protease, RT/RH - Reverse Transkriptase mit RNaseH-Aktivität, IN - Integrase, LP - Leaderpeptid, SU - Oberflächenuntereinheit, TM - Transmembranuntereinheit.

1.2.4 Expression und Funktion foamyviraler Proteine

1.2.4.1 Das PFV Gag-Kapsidprotein

Das PFV Gag-Protein wird von einer ungespleißten mRNA als 71 kDa großes Vorläuferprotein p71^{Gag} im Zytoplasma translatiert. Ungewöhnlich ist, dass kein Gag-Pol-Fusionsprotein, wie für Orthoretroviren üblich, gebildet wird (Linial, 1999). Während der Kapsidmorphogenese oder kurz vor der Partikelfreisetzung findet die Prozessierung des Vorläuferproteins in die Spaltprodukte p68^{Gag} und p3^{Gag} statt (Flügel und Pfrepper, 2003; Giron et al., 1997; Pfrepper et al., 1999). Die einmalige, durch die virale Protease vermittelte, Spaltung des Vorläuferproteins vor der Partikelfreisetzung stellt gegenüber der Prozessierung in Orthoretroviren einen Unterschied dar. Bei Orthoretroviren findet eine weitergehendere Spaltung des Vorläuferproteins in die Untereinheiten Matrix (MA), Kapsid (CA) und Nukleokapsid (NC) statt.

Im reifen Kapsid liegen p68^{Gag} und p71^{Gag} im Verhältnis 1:1 bis 4:1 vor (Cartellieri et al., 2005b). Es konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung des p71^{Gag} essentiell für die Infektiosität der FV ist (Enssle et al., 1997; Konvalinka et al., 1995).

Das Protein weist drei weitere sekundäre Spaltstellen auf, die während des Kapsidzerfalls von Bedeutung zu sein scheinen (Pfrepper et al., 1999). Ein weiterer Unterschied zu orthoretroviralen Gag-Proteinen ist das Fehlen der Cys-His reichen Domänen im C-Terminus von foamyviralen Gag-Proteinen. Anstelle dessen besitzen PFV C-terminal Glycin-Arginin (GR)-reiche Sequenzen, in Form von drei GR-Boxen (Linial, 1999). Die GR-Boxen I-III sind bedeutsam für die reverse Transkription, die Pol-Verpackung und die Kapsidmorphologie (Müllers et al., 2011). Neue Studien zeigen das GRII den Import von Gag in den Zellkern, nicht wie bisher angenommen, durch das nukleäre Kernimportsignal (NLS, engl. nuclear localization signal), sondern durch das CBS (engl. chromatin binding signal) innerhalb der GRII-Region vermittelt (Müllers et al., 2011; Schliephake und Rethwilm, 1994). Zudem beeinflusst die GRII-Box vermutlich die reverse Transkription, da eine Mutation innerhalb der Domäne in einer reduzierten Infektiosität resultiert. Der GRIII-Domäne konnte bislang keine Funktion nachgewiesen werden, eventuell besitzt sie ähnlich wie GRII eine Rolle bei der intrapartikulären reversen Transkription (Müllers et al., 2011).

Im folgenden Abschnitt soll auf Domänen des PFV Gag-Proteins eingegangen werden (Abbildung 1.4). N-terminal befindet sich ein CTRS-Motiv (engl. cytoplasmatic targeting and retention signal), das eine hoch konservierte Aminosäure (R50) enthält und die Kapsidzusammenlagerung am MTOC reguliert (Cartellieri et al., 2005a; Eastman und Linial, 2001; Yu et al., 2006). Dieses Signal leitet die Kapsidmorphogenese zu einer kernnahen Region (Eastman und Linial, 2001; Lehmann-Che et al., 2007; Sfakianos und Hun-

ter, 2003). Weiterhin enthält das PFV Gag-Protein vier Domänen mit coiled-coil Struktur (CC) für die Kapsidzusammenlagerung. Das CC1 Motiv ist für die FV-typische, essentielle Interaktion von Gag und Env verantwortlich. Über das CC2 Motiv interagieren die Gag-Proteine für den Kapsidzusammenbau miteinander (Tobaly-Tapiero et al., 2001). CC3 spielt eine bedeutende Rolle bei der Interaktion von PFV Gag mit der LC8 (engl. light chain 8) des Dynein-Motorproteinkomplexes, wodurch das freigesetzte Kapsid über einen Mikrotubuli-abhängigen Transport zum MTOC gelangt (Petit et al., 2003). Die Bedeutung des CC4 Motivs ist zur Zeit noch unklar.

Die L-Domäne (engl. late) vermittelt eine Interaktion von PFV Gag bzw. von Kapsiden mit Komponenten des zellulären ESCRT-I-Komplexes (engl. endosomal sorting complex required for transport I). Diese Interaktion ist für die späten Schritte der Partikelfreisetzung entscheidend (Patton et al., 2005; Stange et al., 2005).

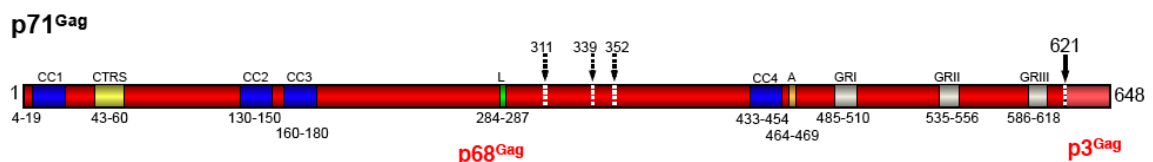


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung des PFV Gag-Vorläuferproteins (Lindemann und Rethwilm, 2011)

Das Protein umfasst 648 Aminosäuren (As). An der primären Spaltstelle (As-Position 621) erfolgt die Prozessierung in die Untereinheiten p68^{Gag} und p3^{Gag}. Drei sekundäre Spaltstellen sind durch gestrichelte Pfeile markiert. Gag-Domänen CC1-CC4 - „coiled-coil“ Domänen, CTRS - „cytoplasmatic targeting and retention signal“, L - „late“ Domäne, A - „assembly“ Domäne (YXXLGL), GRI, II und III - Glycin-Arginin reiche Domänen.

Das p3^{Gag}-Spaltprodukt

Bei der Prozessierung des Vorläuferproteins p71^{Gag} erfolgt die Abspaltung der kleinen p3^{Gag}-Untereinheit nahe des C-Terminus. Das Protein umfasst eine Länge von 27 Aminosäuren (As). Diese Prozessierung ist essentiell für die Infektiosität, jedoch nicht für die Partikelfreisetzung, denn PFV Partikel die nur das Vorläuferprotein enthalten, sind nicht infektiös. Partikel die ausschließlich p68^{Gag} enthalten, zeigen eine wildtypische Morphologie der Partikel sowie eine 100-fach geringere Infektiosität (Enssle et al., 1997; Zemba et al., 1998). Das p3^{Gag}-Protein scheint nicht wesentlich für die Partikelmorphogenese sowie für die Verpackung der Pol-Proteine zu sein. Bisher konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, welche Funktion das p3^{Gag}-Spaltprodukt hat und ob es während der Partikelmorphogenese eingelagert wird. Es wird spekuliert, ob p3^{Gag} für die Penetration, den Kapsidzerfall oder die Bildung des Präintegrationskomplex (PIK) notwendig ist (Zemba et al., 1998).

1.2.4.2 Die enzymatischen PFV Pol-Proteine

Das 127 kDa große Pol-Vorläuferprotein wird von einer separaten, gespleißten mRNA translatiert. Diese Gag-unabhängige Pol-Expression stellt eine weitere Besonderheit der FV gegenüber den Orthoretroviren dar, bei denen die Pol-Expression von der Bildung eines Gag/Pol-Fusionsproteins (FP) abhängig ist. Das Pol-Protein besteht aus den drei enzymatischen Untereinheiten PR, RT und IN (Abbildung 1.5). Es wird angenommen, dass die autokatalytische Spaltung in die funktionellen Domänen Protease/Reverse Transkriptase mit RNase-Aktivität ($p85^{PR/RT/RH}$) und Integrase ($p40^{IN}$) während oder nach der Morphogenese stattfindet (An et al., 2008; Imrich et al., 2000). Eine Prozessierung in die Untereinheiten PR und RT, wie es bei Orthoretroviren erfolgt, konnte bislang aber nicht nachgewiesen werden.

Die IN-Domäne beinhaltet im C-terminalen Teil ein NLS, das für den Kernimport des PIK notwendig ist (Imrich et al., 2000). Vermutlich ist ebenso ein NLS in der PR-RT-Untereinheit vorhanden, denn sowohl dem Pol-Vorläuferprotein als auch dessen Spaltprodukten konnte eine Lokalisation im Zellkern nachgewiesen werden (An et al., 2008; Imrich et al., 2000).

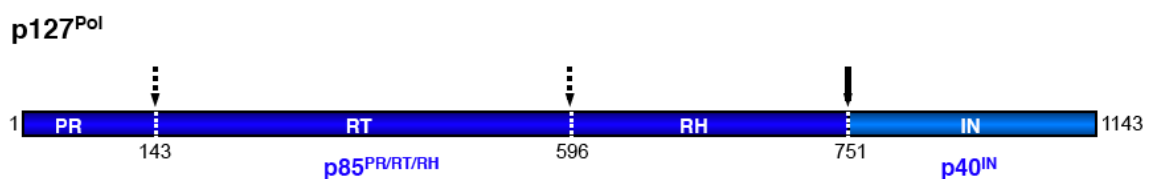


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung des PFV Pol-Vorläuferproteins (Lindemann und Rethwilm, 2011).

Das Protein umfasst 1143 Aminosäuren und wird an Position 751 in die Untereinheiten $p40^{IN}$ und $p85^{PR/RT/RH}$ gespalten. PR - Protease, RT - Reverse Transkriptase, RH - RNaseH, IN - Integrase.

1.2.4.3 Das PFV Env-Glykoprotein

Das 130 kDa große Env-Vorläuferprotein, auch als Hüllprotein bezeichnet, wird von einer gespleißten mRNA an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert. Zunächst ordnet sich das integrale Membranprotein nach einer Typ III Topologie an, bei der jeweils N- und C-Terminus in das Zytoplasma ragen (Abbildung 1.6). Die Verankerung des Env-Glykoproteins in der Membran wird über hydrophobe Abschnitte in der membranspannenden Domäne (MSD) der TM und des Env-LPs bewerkstelligt. Das Vorläuferprotein ist aus den drei Untereinheiten LP ($gp18^{LP}$), SU ($gp80^{SU}$) und TM ($gp48^{TM}$) aufgebaut. Das N-terminale Signalpeptid in der LP-Untereinheit bewirkt die Einschleusung des Env-Vorläuferproteins in den sekretorischen Transportweg der Wirtszelle.

Während des Transports zur Zelloberfläche findet durch Furin- oder Furin-ähnliche zellulären Proteasen die Prozessierung des Vorläuferproteins in die Spaltprodukte statt (Duda et al., 2004; Geiselhart et al., 2004; Lindemann et al., 2001). Duda et al. stellten fest, dass die Prozessierung der LP- und SU-Untereinheit, im Gegensatz zur SU-TM-Spaltung, nicht essentiell für die Infektiosität freigesetzter Partikel ist (Duda et al., 2004). Im Unterschied zu Orthoretroviren bleibt die LP-Untereinheit nach Prozessierung vermutlich über nicht-kovalente Bindungen mit der TM- und SU-Untereinheit verbunden (Lindemann et al., 2001).

Während des Transports durch das ER und Golgi-Netzwerk finden posttranslationale Modifikationen der Glykoprotein-Untereinheiten statt. Dazu zählt die Glykosylierung der intraluminalen Domänen des Env-Proteins. Lediglich zwei von 15 möglichen N-Glykosylierungsstellen, eine in der SU-(N8) und eine in der TM-(N13) Untereinheit, sind essentiell für die Infektiosität der Partikel (Lüftenegger et al., 2005). Zudem wird durch Lysin-vermittelte Ubiquitinierungen des LPs an vier von fünf möglichen Stellen die intrazelluläre Verteilung des Env-Proteins beeinflusst (Stange et al., 2005).

Eine bedeutende Funktion übernimmt das FV Glykoprotein durch die Interaktion des Env-LPs mit dem Gag-Protein, die für eine Partikelfreisetzung absolut notwendig ist. Ein Aminosäureaustausch der zwei konservierten Tryptophane (W) im sogenannten „Budding-Motiv“ (W₁₀XXW₁₃) unterbindet eine Partikelfreisetzung (Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001). In Abwesenheit des PFV Env-Proteins können sich die Kapside zwar intrazellulär anreichern, deren Knospung ist allerdings ausgeschlossen. Aufgrund der Env-abhängigen Partikelknospung werden bei FV gegensätzlich zu Orthoretroviren keine virusähnlichen Partikel (VLPs, engl. virus-like particles) freigesetzt.

Über die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) erfolgt die Bindung an den noch unbekannten Rezeptor auf die Zelloberfläche von infizierbaren Wirtszellen (Duda et al., 2006). Die TM-Domäne vermittelt auf bisher unbekannte Weise die Fusion von viraler und zellulärer Membran. Es konnte gezeigt werden, dass die Fusionsaktivität essentiell von der MSD der TM-Untereinheit abhängt und zusätzlich vom pH-Wert beeinflusst ist (Picard-Maureau et al., 2003; Pietschmann et al., 2000).

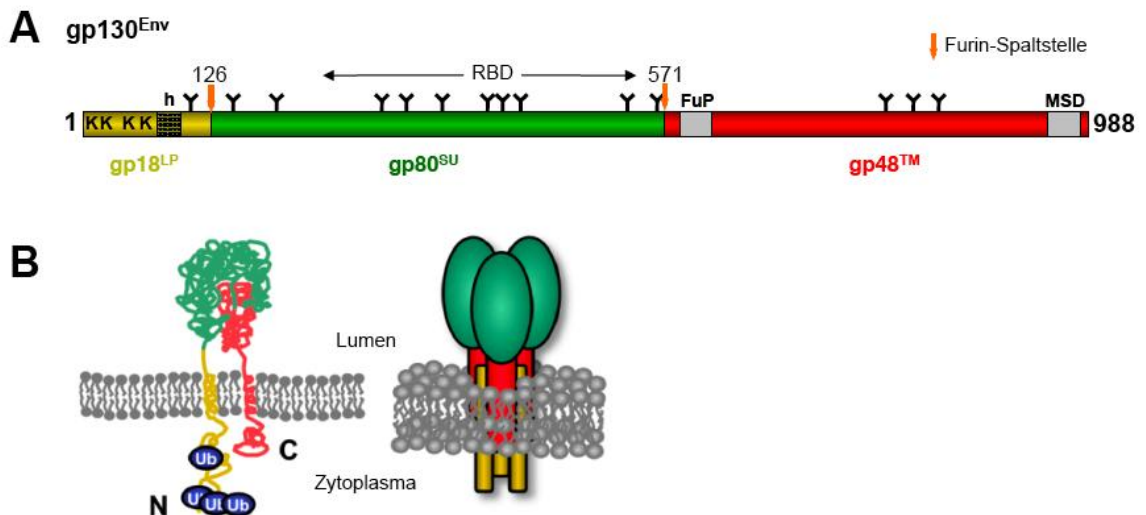


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung des PFV Env-Vorläuferproteins (Lindemann und Rethwilm, 2011)

A) Das Protein umfasst 988 Aminosäuren (As). An As-Positionen 126 und 571 befinden sich zwei Furinspaltstellen, die das Env-Protein in die drei Untereinheiten LP, SU und TM unterteilen. LP - Leaderpeptid, SU - Oberflächenuntereinheit, TM - Transmembranuntereinheit, RBD - Rezeptorbindungsdomäne, h - hydrophobe Domäne, MSD - membranspannende Domäne, FuP - Fusionspeptid, K - Lysin. B) Modell der Organisation der Env-Untereinheiten in monomerer oder trimerer Form in zellulären Membranen. Ub - Ubiquitin

1.2.4.4 Akzessorische Proteine

FV zählen zu den Retroviren mit komplexem Genom, die für zusätzliche akzessorische Proteine mit regulatorischen Funktionen kodieren. Daher trägt das FV-Genom zwei weitere ORFs, von denen die akzessorischen Proteine Tas und Bet exprimiert werden. Beide Proteine werden durch die Aktivität des IP reguliert und werden nicht in freigesetzte Partikel eingelagert (Meiering und Linial, 2001).

Das 36 kDa große Tas-Protein (engl. transactivator of spumaviruses) ist ein viraler Transkriptionsfaktor. Nach der Expression bindet Tas an den U3 LTR-Promotor und mit höherer Affinität an den IP (He et al., 1996; Kang et al., 1998). Damit wird die Expression der Gene für die Strukturproteine (Gag, Pol, Env) eingeleitet und die Tas-Expression verstärkt. Tas weist keine Sequenzhomologien zu anderen retroviralen Transaktivatoren auf und bindet im Gegensatz zum Tat-Protein von HIV-1 und Tax-Protein von HTLV direkt an Regionen der proviralen DNA, die als Tas-responsive Elemente (TRE) bezeichnet werden. Somit agiert Tas über einen individuellen Mechanismus (Erlwein und Rethwilm, 1993; Linial, 1999; Löchelt, 2003).

Ein weiteres akzessorisches Protein ist das Bet-Protein, das von einer zweifach gespleißten mRNA, die die Bereiche des *tas*-ORF mit dem *bet*-2-ORF verbindet, translatiert wird (Muranyi und Flügel, 1991). Stabil Bet-exprimierende Zellen sind gegen eine PFV Superinfektion resistent (Bock et al., 1998). Neue Studien zeigen, dass das Bet-Protein die anti-

virale Funktion der APOBEC3-Proteine (engl. apolipoprotein B mRNA editing catalytic subunit 3), eine antiretrovirale zelluläre Deaminase, der Wirtszelle inhibiert. Das Bet-Protein wirkt einer durch APOBEC3 eingeleiteten Deaminierung des viralen Genoms entgegen und sorgt damit für die Aufrechterhaltung des genetischen Codes.

Weiterhin wird ein Env-Bet-FP in den Überstand sekretiert, welches sich aus extrazellulären Teilen des Hüllproteins und Bet zusammensetzt (Giron et al., 1998; Lindemann und Rethwilm, 1998). Das 170 kDa große Protein scheint für die virale Replikation *in vitro* entscheidend zu sein. Bislang konnte dem Protein keine eindeutige Funktion zugeordnet werden.

1.2.5 Replikationszyklus

Die Umschreibung des RNA-Genoms in DNA ist kennzeichnend für die Familie der Retroviren. In einigen Schritten der viralen Replikation ähneln die FV allerdings eher den Hepadnaviren. Aufgrund dieser Abweichung werden die FV oftmals als unkonventionelle Retroviren bezeichnet (Linial, 1999).

Der Replikationszyklus ist schematisch in Abbildung 1.7 dargestellt. Die Infektion einer Wirtszelle beginnt mit Adsorption der FV Partikel an den bisher unbekannten Zelloberflächen-Rezeptor der Zielzelle. Das breite Wirtsspektrum deutet darauf hin, dass es sich bei dem Rezeptor um ein ubiquitäres Molekül handelt. Neue Studien zeigen, dass die Bindung an extrazelluläres, sich an der Zelloberfläche befindliches Heparansulfat, ein zentraler Faktor für die foamyvirale Aufnahme darstellt (Nasimuzzaman und Persons, 2012; Plochmann et al., 2012). Nach der Bindung an den Rezeptor erfolgt vermutlich eine pH-abhängige endozytotische Aufnahme von FV (Picard-Maureau et al., 2003; Stirnagel et al., 2012). Nach der Penetration gelangen die viralen Kapside in das Zytoplasma der Wirtszelle. Die FV-Kapside werden über einen Dynein-Dynaktin-abhängigen Mechanismus zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC engl. microtubule organizing center) transportiert (Petit et al., 2003; Saib et al., 1997). Am MTOC sind die Kapside noch bis zu mehreren Wochen intakt (Lehmann-Che et al., 2007). Der Zerfall der Kapside (engl. uncoating) wird durch die Mitose der Wirtszelle eingeleitet und steht unter dem Einfluss viraler und zellulärer Proteasen (Lehmann-Che et al., 2005).

Infolge des Kapsidzerfalls bildet sich ein PIK aus dem viralen DNA-Genom, der Integrase sowie möglicherweise weiteren unbekannten Proteinen (Lo et al., 2010). Die Integration des FV-Genoms erfolgt durch Aktivität der Integrase präferentiell in nicht transkriptionell aktiven Bereichen des Wirtszellgenoms (Juretzek et al., 2004; Nowrouzi et al., 2006; Trobridge et al., 2006). Zunächst werden durch die geringe Basalaktivität des IP die frühen akzessorischen Gene exprimiert. Das exprimierte Tas-Protein aktiviert den viralen LTR-Promotor und leitet die Transkription der späten viralen Gene *gag*, *env* und *pol* ein.

Anschließend werden die viralen mRNAs unter anderem vermutlich durch einen CRM1-abhängigen Weg ins Zytoplasma exportiert (Bodem et al., 2011). Möglicherweise trägt auch FV Gag zum RNA Export bei (Renault et al., 2011). Die Translation der Gag- und Pol-Vorläuferproteine findet an den freien Ribosomen des Zytoplasmas statt, wohingegen die Env-Vorläuferproteine an den Ribosomen des rauen ER gebildet werden. Am MTOC erfolgt über einen bisher nicht genau bekannten Mechanismus die Einlagerung der genomischen RNA und der Pol-Proteine in die Kapside. Während oder kurz nach der Kapsidzusammenlagerung wird die reverse Transkription des RNA-Genoms durchgeführt (Moebes et al., 1997). Ein bedeutender Unterschied der Foamyviren gegenüber anderen Retroviren ist der Zeitpunkt der reversen Umschreibung. Während bei anderen Retroviren der RT-Schritt ein frühes Ereignis während der Replikation ist, direkt nach dem Eintritt in die Zelle, geschieht die Umschreibung bei FV bereits weitestgehend in der Produzentenzelle (Moebes et al., 1997; Roy et al., 2003; Yu et al., 1996; Yu et al., 1999). Neue Studien zeigen, dass auch das PFV eine frühe reverse Transkription durchführen kann (Delelis et al., 2003; Zamborini et al., 2010). Aufgrund der Bildung viraler dsDNA in der infizierten Wirtszelle kann sich die DNA in das Genom der Wirtszelle reintegrieren (Heinkelein et al., 2000).

Für Membrantransport und Partikelknospung ist vermutlich eine Interaktion von Gag- und Env-Proteinen erforderlich (Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Lindemann et al., 2001; Pietschmann et al., 1999). Die Env-abhängige Knospung des Kapsids stellt ein gesondertes Merkmal der FV gegenüber der Orthoretroviren dar. Die Orthoretroviren sind zur alleinigen Freisetzung des foamyviralen Kapsids als VLP befähigt. Eine weitere Besonderheit der FV ist die subvirale Partikelabschnürung, die auch bei Hepadnaviren beobachtet wird (Shaw et al., 2003; Stange et al., 2008; Stanke et al., 2005). Subvirale Partikel sind von der Wirtszellmembran abstammende Membranvesikel, die virale Glykoproteine, aber kein Kapsid oder virales Genom eingelagert haben.

Die Knospung foamyviraler Partikel erfolgt hauptsächlich an intrazellulären Membranen. Nach der Partikelfreisetzung finden keine weiteren Reifungsprozesse statt, wie für Orthoretroviren üblich, die als unreife Partikel freigesetzt werden.

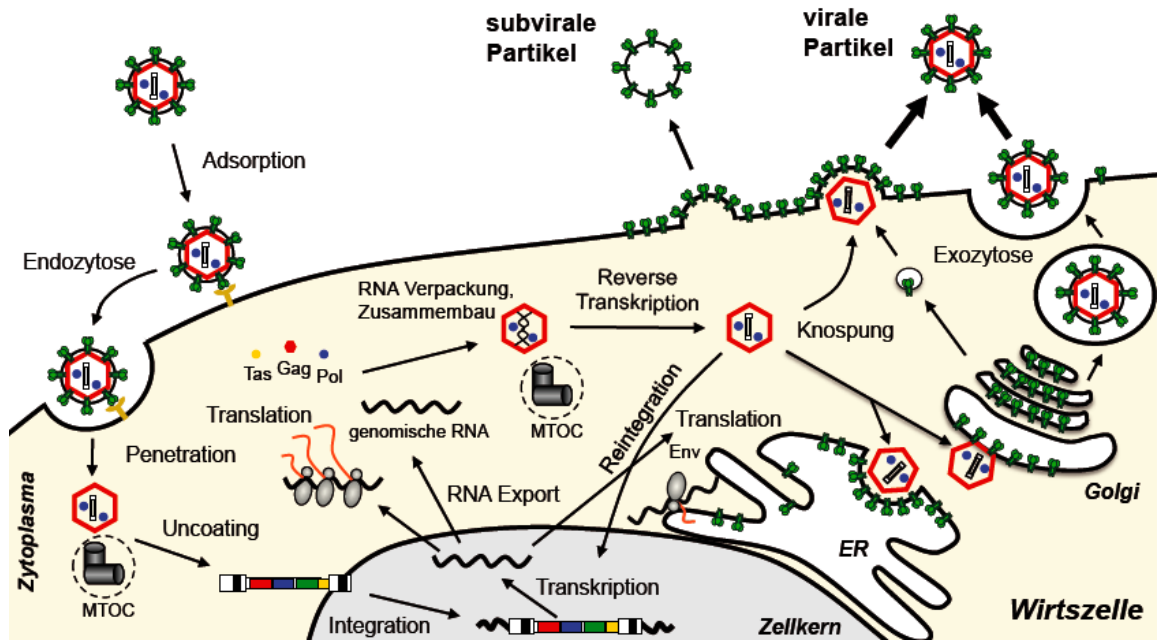


Abbildung 1.7 Schematische Darstellung des PFV-Replikationszyklus (verändert nach Lindemann und Rethwilm, 2011)

1.2.6 Foamyvirale Vektorsysteme

Innerhalb der letzten 15 Jahre wurden Vektorsysteme basierend auf PFV, Macaque Simian Foamy Virus (SFVmac) und FFV entwickelt, um als Transfervehikel für heterologe Nukleinsäuren zu fungieren. FV ermöglichen einen sicheren und effizienten Gentransfer von Markergenen und therapeutisch wirksamen Genen. Die stabile Integration ins Wirtsgenom birgt allerdings auch die Gefahr intakte Gene zu zerstören oder Onkogene zu aktivieren.

Im Hinblick der Analyse des foamyviralen Replikationszyklus können replikationskompetente und replikationsdefiziente Vektorsysteme zum Einsatz kommen. Das replikationsdefiziente 4-Komponenten-Vektorsystem besteht aus vier Expressionsplasmiden, einem Transfektor und drei Verpackungskonstrukten (Abbildung 1.8). Dem System fehlen für die Replikation essentielle Genomabschnitte, sodass sie nur eine einmalige Infektion der Zielzellen ermöglichen. Die Bildung neuer infektiöser Partikel ist ausgeschlossen. Der einmalige Infektionszyklus mit dem 4-Komponenten-Vektorsystem macht das Arbeiten deutlich sicherer im Unterschied zum proviralen System. Diese Vektorsysteme bieten zudem die Möglichkeit einer zielgerichteten Manipulation einer separaten Komponente zur funktionellen Analyse. Der Transfektor beinhaltet die virale genomische RNA und ein Markergen unter Kontrolle eines internen heterologen Promotors (Lindemann und Rethwilm, 2011). Die Regulation der Transkription des Genoms erfolgt über einen starken konstitutiven Promotor des Cytomegalie Virus (CMV, engl. cytomegalovirus immediate-early promotor). Die CAS-Elemente sind für einen effizienten

Gentransfer notwendig. CAS I beinhaltet die PBS, die CAS II-Region ist auf 1,2 kb verkürzt und trägt die Information für die Verpackung der RNA und des Pol-Proteins. Innerhalb der CAS III-Region wurde die U3-Region des 3' LTR deletiert, in der virale Promotor- und Enhancersequenzen liegen. Die bei der reversen Transkription nicht funktionell gebildete U3-Region des 5' LTR bewirkt eine verminderte Aktivierung von potenziellen Proto-Onkogenen bei der Integration ins Wirtsgenom. Systeme mit entsprechenden Modifikationen werden als SIN-(engl. self inactivating) Vektoren bezeichnet.

Zur Bildung viraler Partikel werden die vier Konstrukte in eine Verpackungszelllinie kotransfiziert und ermöglichen einen einmaligen Infektionszyklus. Bei der Bewertung der Infektionsergebnisse muss stets berücksichtigt werden, dass die Expression der Viruskomponenten Gag, Pol und Env im Gegensatz zum natürlichen System erhöht ist, was auch in einem höheren infektiösen Titer resultiert.

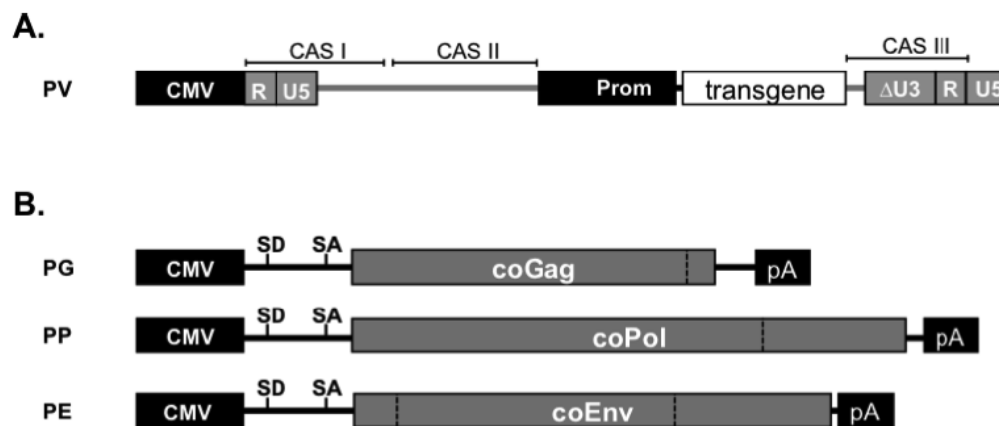


Abbildung 1.8 PFV 4-Komponenten-Vektorsystem (Lindemann und Rethwilm, 2011)

Das PFV 4-Komponenten-Vektorsystem besteht aus A) einem Transfervektor und B) drei Verpackungsplasmiden, die die Strukturproteine Gag, Pol und Env exprimieren. CMV - Promotor/Enhancer des Cytomegalie Virus, R - redundante Region, U5/U3 - unique 5'- bzw. 3'-Region, ΔU3 - U3-Region mit interner 558 bp Deletion, CAS I, II und III - cis-aktive Sequenz I, II und III, SD - Spleißdonor, SA - Spleißakzeptor, pA - Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons

Im Gegensatz zum 4-Komponenten-Vektorsystem enthalten die replikationskompetenten proviralen Expressionsvektoren auf einem Plasmid die komplette genetische Information für die Bildung infektiöser Partikel (Abbildung 1.9). Die Strukturgene (*gag*, *pol*, *env*) und akzessorischen Gene (*tas* und *orf-2*) werden durch einen 5' LTR und einen 3' LTR flankiert. Die U3-Region des 5' LTR ist durch den konstitutiven CMV-Promotor ersetzt, der die Transkription reguliert. Vorteil dieses Systems ist die dem natürlichen viralen System annähernde Proteinexpression und Infektiosität.



Abbildung 1.9 Provirales Konstrukt am Beispiel von pczHSRV2 wt (verändert nach Lehmann-Che et al., 2005)

Alle viralen Komponenten zur Produktion infektiöser viraler Partikel sind auf einem Plasmid kodiert. CMV - Promotor/Enhancer des Cytomegalie Virus, LTR - long terminal repeat, R - redundante Region, U5/U3 - unique 5'- bzw. 3'-Region, IP - interner Promotor, wt - Wildtyp

1.3 Zielsetzung

Foamyviren zeichnen sich in der Familie der Retroviren durch zahlreiche Besonderheiten aus, beispielsweise in der Genomorganisation, in der Expression der viralen Proteine und in ihrem Replikationszyklus. Einen essentiellen Schritt im foamyviralen Replikationszyklus zur Bildung infektiöser viraler Partikel stellt dabei die Protease-vermittelte Prozessierung der Gag- und Pol-Vorläuferproteine in ihre Untereinheiten dar. Bisher wurde angenommen, dass FV mit inaktivierter PR-Aktivität nicht infektiös sind, da die Prozessierung der p71^{Gag}-Proteine nicht stattfinden kann (Lehmann-Che et al., 2005).

Kürzlich konnten Hütter et al. im Kontext eines expressionsoptimierten PFV 4-Komponenten-Vektorsystems zeigen, dass Pol-Verpackungskonstrukte, die eine inaktivierte PR-Domäne besitzen, zur Bildung infektiöser Partikel führen (Hütter et al., unveröffentlicht). Die gebildeten Viruspartikel waren jedoch nur bei Kotransfektion mit prozessierten p68^{Gag}-Verpackungskonstrukten infektiös. Die Infektiosität von Partikeln korrelierte hierbei immer mit der Fähigkeit zur intrapartikulären reversen Transkription des verpackten viralen RNA-Genoms. Die Versuche führten zu der Schlussfolgerung, dass vermutlich die Gag-Prozessierung zu p68^{Gag} und p3^{Gag} die reverse Transkription des viralen RNA-Genoms zu DNA im Viruspartikel, dass in der Zielzelle in stabil integriertem Genom resultiert, initiiert. FV Partikel die nur aus p68^{Gag}-Kapsiden bestehen, weisen jedoch im Vergleich zu wildtypischen viralen Partikeln einen reduzierten DNA-Gehalt, sowie einen 10-fach reduzierten infektiösen Titer auf. Das unprozessierte Gag-Vorläuferprotein p71^{Gag} alleine wirkt indes wahrscheinlich inhibitorisch auf die RT-Aktivität und verhindert so die intrapartikuläre reverse Transkription ohne vorherige Gag-Prozessierung. Auch kann spekuliert werden, dass das abgespaltene, reife p3^{Gag}-Protein einen positiven Effekt auf die reverse Transkription ausübt, was die reduzierte Infektiosität von reinen p68^{Gag} Partikeln erklären würde. Die Übertragung der Kombination aus inaktivierten-Protease- und p68^{Gag}-Mutante auf ein virusähnlicheres, replikationskompetentes System (provirales System) resultierte aus bislang ungeklärten Gründen in nicht-infektiösen Viruspartikeln.

Ziel der Masterarbeit ist die Charakterisierung eines möglicherweise stimulatorischen Einflusses des p3^{Gag}-Proteins auf die RT-Aktivität, sowohl im PFV 4-Komponenten-Vektorsystem wie auch im proviralen Expressionssystem. Für die Untersuchung werden zwei expressionsoptimierte p3^{Gag}-Fusionskonstrukte generiert und durch Kotransfektion mit den Komponenten der jeweiligen Systeme *in trans* exprimiert. Neben dem Effekt auf die Infektiosität soll zudem die zelluläre Expression und die Proteinzusammensetzung im Virus analysiert werden.

Ein zweiter Teil besteht in der Untersuchung einer weiteren potenziellen Ursache, weshalb die Transfektion des PR-defizienten p68^{Gag}-Konstruktes im Kontext des proviralen Expressionskonstruktes im Gegensatz zum 4-Komponenten-Vektorsystem nicht zur Bildung infektiöser Viren führt. Durch Zugabe des expressionsoptimierten p68^{Gag}-Konstruktes soll geklärt werden, ob das provirale Expressionsplasmid zu geringe Mengen an p68^{Gag} für die Bildung infektiöser Partikel exprimiert.

2. MATERIAL

2.1 Antibiotika

Tabelle 2.1 Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Ampizillin	100 µg/ml	Roth
Penizillin/Streptomycin	10 µg/ml	Invitrogen
Zeozin™	200 µg/µl	Invitrogen

2.2 Antikörper

Tabelle 2.2 Verwendete Antikörper

Primär-Antikörper	Verdünnung	Referenz
Kaninchen α -PFV Gag (936)	1:1000	Mannigel et al., 2007
Kaninchen α -PFV Env (4F34)	1:200	Müllers et al., 2011
Maus α -PFV RT (15E10)	1:400	Imrich et al., 2000
Maus α -PFV IN (3E11)	1:100	Imrich et al., 2000
Maus α -GAPDH	1:50.000	Sigma-Aldrich
Maus α -GFP	1:5000 (ZL)	Roche
	1:1000 (PP)	
Ziege α -HA	1:2500	Bethyl
Sekundär-Antikörper		
α -Kaninchen IgG HRP-konjugiert	1:1000	DAKO
α -Maus IgG HRP-konjugiert	1:1000	DAKO
α -Ziege IgG HRP-konjugiert	1:5000	Jackson Immuno Research

2.3 Bakterienstämme

Tabelle 2.3 Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
JM109	F' (<i>traD36 proAB lacIqZΔM15</i>), <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>rk-</i> , <i>mk+</i>), <i>mcrA</i> , <i>supE44</i> , <i>e-gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac- proAB</i>)	Stratagene
NEB 5 α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ</i> (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1</i> <i>hsdR17</i>	New England BioLabs
Top-10F'	F-, <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80/ <i>lacZΔM15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara- leu</i>)7697, <i>galU galK</i> , <i>rpsL</i> , (<i>StrR</i>), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

2.4 Enzyme

Tabelle 2.4 Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas
Lysozym	Merck
<i>Pwo</i> -Polymerase	Peqlab
Restriktionsenzyme	Fermentas, NEB
RNase A	Roth
Subtilisin	Sigma-Aldrich
T4-DNA-Ligase	Fermentas

2.5 Größenmarker

Tabelle 2.5 Verwendete Größenstandards

Proteingrößenstandard	Hersteller
PageRuler® Prestained Protein Ladder (~10 – 170 kDa)	MBI Fermentas
Nukleinsäurelängenstandards	
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas

2.6 Chemikalien

Soweit nicht anders gekennzeichnet, wurden Chemikalien der Firmen Applichem, Merck, Rot, Serva und Sigma-Aldrich verwendet.

2.7 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Puffer und Lösungen mit Aqua dest. auf ihr Endvolumen aufgefüllt.

2.7.1 Lösungen und Puffer molekularbiologischer Methoden

Plasmidpräparation Lösung I:	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl, pH 8 10 mM Na ₂ EDTA, pH 8 vor Gebrauch 5 mg/ml Lysozym zugeben
Plasmidpräparation Lösung II:	1 % SDS 200 mM NaOH
Plasmidpräparation Lösung III:	3 M Kaliumacetat pH 4,8 (konzentrierte Essigsäure)
3 M Natriumacetat	
RNaseA-Lösung:	2 mg/ml RNaseA, aufgefüllt mit TE-Puffer
50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer):	40 mM Tris-Base 1 mM Na ₂ EDTA, pH 8 20 mM Essigsäure vor Gebrauch mit Aqua dest. auf 1x TAE-Puffer verdünnen
10x Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer):	100 mM Tris/HCl, pH 8 10 mM Na ₂ EDTA, pH 8 vor Gebrauch mit Aqua dest. auf 1x TE-Puffer ver- dünnen

2.7.2 Lösungen und Puffer proteinbiochemischer Methoden

10 % Ammoniumpersulfat (APS)

10x Anodenpuffer:

0,2 M Tris-Base

pH 8,9 (konzentrierte Salzsäure)

vor Gebrauch mit Aqua dest. auf 1x Anodenpuffer
verdünnen

Antikörperlösung (AK-Lösung):

Verdünnung der AK mit Blockierungslösung

Blockierungslösung:

5 % Milchpulver

aufgefüllt mit PBS-T

5x Kathodenpuffer:

0,1 M Tris-Base

0,1 M Tricin

0,1 % SDS

vor Gebrauch mit Aqua dest. auf 1x Kathodenpuffer
verdünnen

10x Lysepuffer:

10 mM Tris/HCl, pH 8

140 mM NaCl

0,025 % NaN₃

1 % Triton® X-100

vor Gebrauch mit Aqua dest. auf 1x Lysepuffer ver-
dünnen

5 % Natriumazid:

aufgefüllt mit PBS-T

1x PBS:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

6,5 mM Na₂HPO₄·2H₂O

1,5 mM KH₂PO₄

PBS-T:

10x PBS

0,5 % Tween ®20

2x PPPC:

100 mM Tris/HCl, pH 6,8

24 % Glycerol

8 % SDS

0,02 % Coomassie blue G-250

2 % Dithiothreitol (DTT)

1x Transferpuffer:	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 0,037 % SDS 20 % Methanol
1x Transferpuffer ohne SDS:	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 20 % Methanol
1x Transferpuffer mit 40 % Methanol:	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 40 % Methanol
Tricine-Gelpuffer:	3 M Tris-Base 0,3 % SDS pH 8,45 (konzentrierte Salzsäure)

2.7.3 Lösungen und Puffer zellbiologischer und virologischer Methoden

2 M CaCl ₂ :	sterilfiltriert
6 % Formaldehydlösung:	hergestellt mit 37 % Formaldehydlösung aufgefüllt mit 1x PBS
1x Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):	pH 7,2 ohne CaCl ₂ und MgCl ₂ (GIBCO™ Invitrogen)
100x Polyethylenimin :	100 mg/ml PE aufgefüllt mit 1x PBS, sterilfiltriert (0,45 µm)
PMSF:	10 mg/ml aufgefüllt mit EtOH
20 % Sucroslösung:	584 mM Sucrose aufgefüllt mit 1x PBS, sterilfiltriert (0,45 µm)
1x Trypsin-EDTA:	0,5 g/l Trypsin 0,2 g/l EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung A ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , mit Phenolrot (GIBCO™ Invitrogen)

2.8 Medien

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle Medien mit Aqua dest. auf ihr Endvolumen aufgefüllt.

2.8.1 Bakterienkulturmedien

LB-Agar (engl. lysogenic broth):	Difco™ LB Agar (Becton-Dickinson) 20 g/l
5x LB-Medium:	LB Broth Base (Gibco™ Invitrogen) 100 g/l vor Gebrauch mit Aqua dest. auf 1x LB-Medium verdünnen
SOC-Medium:	2 % Bacto Tryptone 0,5 % Bacto Yeast Extract 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O 10 mM MgSO ₄ x 7H ₂ O 20 mM Glukose

2.8.2 Zellkulturmedien

D-MEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco, 1959#13) mit GlutaMAX, Natriumpyruvat, Pyridoxin, 4500 mg/l D-Glukose (GIBOCO™ Invitrogen)
D-MEM (komplett):	DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (GIBCO™ Invitrogen) und 0,1 % Penizillin-Streptomycin-Lösung (GIBCO™ Invitrogen)

2.9 Oligonukleotide

Tabelle 2.6 Verwendete Oligonukleotide

Primer-Nr.	Sequenz 5'→ 3'	Beschreibung
609	cagactgttccttccatgggtc	Sequenzierprimer, sense, für p3 ^{Gag} , bindet upstream des PFV <i>gag</i> -ORF
916	tggcacagtcgaggctgatcagcg	PCR-Primer, antisense, bindet downstream des PFV <i>gag</i> -ORF zur Generierung von PFV p3 ^{Gag} -CHA Fusionsprotein (FP)
3378	caggaattccaccatgaccgtgaccagagcgc	PCR-Primer, sense, amplifiziert p3 ^{Gag} zur Generierung von PFV p3 ^{Gag} -CHA FP, beinhaltet Start-Codon (ATG)

2.10 Plasmide

Tabelle 2.7 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pcDNA3.1zeo+	eukaryotisches Expressionsplasmid mit Polylinker (MCS, engl. multiple cloning site) zwischen CMV-Promotor und pA-Signal des „bovine growth hormone“ (bGH), Ampizillinresistenz (Amp ^R) und Zeozinresistenz (Zeo ^R)	Invitrogen
pUC19	prokaryotisches Expressionsplasmid, <i>lacZ</i> -ORF, Amp ^R	Invitrogen
puc2MD9	auf pUC19 basierender, replikationsdefizienter PFV Vektor, enthält <i>egfp</i> -Kassette unter Kontrolle des „SpleenFocus Forming Virus“ (SFFV) U3 Promotors, beinhaltet alle notwendigen CAS-Elemente des <i>gag</i> - und <i>pol</i> -ORF, Amp ^R	Stirnengel et al., 2010

Plasmid	Beschreibung	Referenz
puc2MD9Red	auf pUC19 basierender, replikationsdefizienter PFV Vektor, enthält <i>dsRedEx2</i> -Kassette unter Kontrolle des SFFV U3 Enhancer/Promotors, beinhaltet alle notwendigen CAS-Elemente des <i>gag</i> - und <i>pol</i> -ORF, Amp ^R	Lindemann, un- veröffentlicht
pcoPE	CMV-Promotor betriebenes eukaryotisches Expressionsplasmid für das expressionsoptimierte PFV Env-Protein, basiert auf pcDNA3.1zeo+, enthält zusätzlich CMV Intron A für die Bildung gespleißter mRNAs, Amp ^R und Zeo ^R	Müllers et al., 2011
pcoPG4	CMV-Promotor betriebenes eukaryotisches Expressionsplasmid für das expressionsoptimierte PFV Gag-Protein, basiert auf pcDNA3.1zeo+, enthält zusätzlich CMV Intron A für die Bildung gespleißter mRNAs, Amp ^R und Zeo ^R	Stirn timer et al., 2010
pcoPG4 1-621	CMV-Promotor betriebenes eukaryotisches Expressionsplasmid für das expressionsoptimierte PFV Gag-Protein, basiert auf pcoPG4, enthält vorzeitiges Stop-Codon an Aminosäure (As)-Position 622 zur Bildung von p68 ^{Gag} , Amp ^R und Zeo ^R	Lindemann, un- veröffentlicht
pcoPG4 CeGFP	auf pcoPG4 basierendes eukaryotisches Expressionsplasmid für das C-terminale Gag-eGFP FP	Stirn timer et al., 2010
pcoPG4 CHA	auf pcoPG4 basierendes Expressionsplasmid zur Bildung des C-terminalen PFV Gag-HA (Hämagglutinin) FP	Stirn timer et al., 2010
pcoPP	CMV-Promotor betriebenes eukaryotisches Expressionsplasmid für das expressionsoptimierte PFV Pol-Protein, basiert auf pcDNA3.1zeo+, enthält zusätzlich CMV Intron A für die Bildung gespleißter mRNAs, Amp ^R und Zeo ^R	Müllers et al., 2011

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pcoPP1 (iPR)	CMV-Promotor betriebenes eukaryotisches Expressionsplasmid für das expressionsoptimierte PFV Pol-Protein, basiert auf pcoPP, enthält inaktivierte Protease D24A, Amp ^R und Zeo ^R	Lindemann, un- veröffentlicht
pczHSRV2 EM26	CMV-Promotor getriebenes Konstrukt für ein PFV Provirus, fehlende EcoRI Schnittstelle im Vergleich zu pczHSRV2 wt, Amp ^R und Zeo ^R	Lindemann et al., 2001
pczHSRV2 p68st	CMV-Promotor getriebenes Konstrukt für ein PFV Provirus, basierend auf pczHSRV2 WT, enthält ein vorzeitiges Stoppcodon an As-Position 622 zur Bildung von p68 ^{Gag} , Amp ^R und Zeo ^R	Lindemann, un- veröffentlicht
pczHSRV2 p68st iPR	CMV-Promotor getriebenes Konstrukt für ein PFV Provirus, basierend auf pczHSRV2 p68st, enthält inaktivierte Protease D24A, Amp ^R und Zeo ^R	Lindemann et al., 2001
peGFP-C1	CMV-Promotor betriebenes eGFP-Expressionsplasmid, Kanamycinresistenz und Neomycinresistenz	Clontech

Tabelle 2.8 Hergestellte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pcoPG p3CeGFP	auf pcoPG4 CeGFP basierendendes eukaryotisches Expressionsplasmid zur Bildung des C-terminalen PFV p3 ^{Gag} -eGFP FP
pcoPG p3CHA	auf pcoPG4 CHA basierendendes eukaryotisches Expressionsplasmid zur Bildung des C-terminalen p3 ^{Gag} -HA FP

2.11 Weitere Materialien und kommerzielle Testsysteme

Tabelle 2.9 Verwendete kommerzielle Kits und weitere Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Amersham™ Hybond™- ECL 0,2 µm oder 0,45 µm	GE Healthcare
Biozym LE Agarose	Biozym
6x DNA-Loading Dye	Fermentas
GENECLEAN® Turbo Kit	QBiogene
Immobilon™ Western Chemiluminescence HRP Substrate Kit	Millipore
PEI	Sigma-Aldrich
QIAshredder™	Qiagen
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth

2.12 Zelllinien

Tabelle 2.10 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
293T	humane embryonale Nierenepithelzellen, enthalten stabil integriertes Expressionsplasmid, welches das große T-Antigen des SV40-Virus und eine Neomycinresistenz kodiert	DuBridge et al., 1987
HT1080	humane Bindegewebszellen eines Fibrosarkoms	Rasheed et al., 1974
HT1080 PLNE	humane Zellen eines Fibrosarkoms, enthalten NLS- <i>egfp</i> -Kassette unter Kontrolle des foamyviralen LTR	Stanke et al., unveröffentlicht

3. METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der verwendeten *E. coli* Stämme erfolgt aerob auf LB-Agarplatten oder als Suspensionskultur in flüssigem LB-Medium unter Schütteln (210 rpm) über Nacht bei 37°C. Zur Selektion transformierter Bakterien wird Ampizillin (100 µg/ml) zugesetzt.

3.1.2 Plasmidextraktion aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse

Die Plasmidextraktion beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und erfolgt zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mit Hilfe von drei Reagenzien. Plasmidpräparation-Lösung I bewirkt zunächst das Aufbrechen der Zellwände. Das in Lösung II enthaltene NaOH und SDS führt anschließend zur Denaturierung der Proteine und der dsDNA durch eine pH-Verschiebung in den alkalischen Bereich. Durch pH-Neutralisation (Lösung III) kann sich die Plasmid-DNA aufgrund der Konformation wieder vollständig renaturieren.

3.1.2.1 Plasmid-Minipräparation

Die Plasmid-Minipräparation wird vorwiegend zum Prüfen positiver Klone im Anschluss einer Transformation nach Ligation durchgeführt. Dafür erfolgt die Inkubation einer Kolonie transformierter Bakterien in 2 ml flüssigem LB-Medium bei 37°C und 200 rpm über Nacht. Anschließend werden die Bakterien pelletiert (13.000 rpm, 13 min) und mit 100 µl eiskalter Lösung I und 10 µl RNaseA-Lösung resuspendiert. Danach werden 100 µl Lösung II zugegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Es folgt die Zugabe von 200 µl eiskalter Lösung III und erneut vorsichtiges Mischen des Ansatzes. Im folgenden Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 15 min) werden Zellreste, Proteine und genomische DNA in der Suspension gefällt. 350 µl des Plasmid-DNA-haltigen Überstands werden mit 250 µl Isopropanol versetzt und gut gemischt. Im nächsten Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 15 min) wird die Plasmid-DNA pelletiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wird durch Zugabe von 100 µl 70 %igem Ethanol und Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min) gewaschen und danach im Exsikkator getrocknet. Abschließend wird das Pellet in 30 µl Aqua dest. gelöst.

3.1.2.2 Plasmid-Midipräparation

Für die Gewinnung größerer Mengen spezifischer Plasmid-DNA mit hoher Reinheit wird die Plasmid-Midipräparation herangezogen. Hierfür werden 100-200 ml einer angeimpften Bakteriensuspension pelletiert (5000 rpm, 5 min), in 5 ml eiskalter Lösung I, 150 µl RNaseA-Lösung und einer Spatelspitze Lysozym resuspendiert. Anschließend werden 5 ml Lösung II zugegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Nach dem Beifügen von 10 ml eiskalter Lösung III wird der Ansatz erneut vorsichtig gemischt und bei 17.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird durch eine mit Mull gestopfte Spitze in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit 12 ml Isopropanol gemischt und bei 17.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Die pelletierte DNA wird mit 10 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend im Exsikkator getrocknet. Daraufhin wird das Pellet in 1 ml TE-Puffer und 25 µl RNaseA-Lösung bei 37°C für 1 h gelöst und die restliche RNA verdaut. Um die Reinheit der DNA zu erhöhen, wird nachfolgend eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

3.1.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion und DNA-Präzipitation

Der DNA-Lösung werden 900 µl Phenol beigefügt, für 10 sec gevortext und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der DNA-haltige, wässrige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 900 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) beigefügt, der Ansatz gevortext und zentrifugiert (13.000 rpm, 3 min). Der wässrige Überstand wird erneut in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt, mit 900 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gut vermischt und wiederum zur Phasentrennung zentrifugiert (13.000 rpm, 3 min). Der DNA-haltige Überstand wird zur anschließenden Präzipitation abgenommen. Hierbei wird die DNA-Lösung mit 100 µl 3 M Natriumacetat und 600 µl Isopropanol vorsichtig vermischt und die ausgefallene DNA durch Zentrifugation (13.000 rpm, 15 min) pelletiert. Nach dem Waschen des Pellets mit 500 µl 70 %igem Ethanol erfolgt die Trocknung im Exsikkator. Das Pellet wird in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und die DNA-Konzentration auf 1,0 µg/ml eingestellt (siehe Kapitel 3.1.4.3). Die Lagerung der DNA erfolgt bei -20°C.

3.1.3 DNA-Klonierung

3.1.3.1 PCR

Die PCR dient zur Amplifikation von DNA-Fragmenten bestimmter Länge die zur Klonierung eingesetzt werden. Sie wurde mit der thermostabilen *Pwo*-Polymerase mit 3'-5' proof-reading Aktivität durchgeführt, um Mutationen während der PCR zu vermeiden. Im

Gegensatz zur *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase besitzt die *Pwo*-Polymerase allerdings eine geringere Synthesegeschwindigkeit (500 bp/min).

Tabelle 3.1 PCR-Reaktionsansatz

Komponente	Volumen
PCR-Template (200 ng/μl)	1,0 μl
<i>Pwo</i> -Polymerase (2 U)	1,0 μl
10x <i>Pwo</i> -Puffer komplett	5,0 μl
Sense Primer (100 pmol/μl)	1,0 μl
Antisense Primer (100 pmol/μl)	1,0 μl
dNTP (10 mM)	1,0 μl
RNase freies H ₂ O	40 μl
	50 μl

Tabelle 3.2 PCR-Reaktionsbedingungen

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95°C	5 min
Denaturierung	30	95°C	30 sec
Annealing		T _a	30 sec
Synthese		72°C	2 min/kb PCR Produkt
Synthese	1	72°C	5 min
		4°C	∞

T_a= Primerspezifische Annealingtemperatur, T_a= T_m -5°C, (T_m= Schmelzpunkt des Primers)

T_m berechnet sich nach Zusammensetzung der Nukleotide des Primers:

T_m= 2x(#A+#T) + 4x(#G+#C). #A,#T,#G,#C- Anzahl der Nukleotide

3.1.3.2 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen vom Typ II, die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden. Eingesetzt werden Restriktionsenzyme einerseits analytisch zur Überprüfung der Sequenzidentität einer DNA und andererseits qualitativ für die Gewinnung von DNA-Fragmenten zur Klonierung. Beim Schneiden der DNA wird zwischen zwei Typen unterschieden. Es können sticky ends (klebrige Enden) mit 3' oder 5' Überhängen oder blunt ends (glatte Enden) ohne Überhänge entstehen.

Die Proben werden jeweils nach den Angaben in Tabelle 3.3 angesetzt und für 2 h verdaut. Die einzustellenden Reaktionsbedingungen (Temperatur, Puffer) richten sich nach den Herstellerangaben. Ist ausschließlich eine analytische Überprüfung erforderlich, können FastDigest® Enzyme (Fermentas) zum Einsatz kommen. Diese Enzyme ermöglichen

einen Restriktionsverdau in nur 15 min. Der dafür verwendete 10x FastDigest® Green Puffer dient gleichzeitig als Ladepuffer im Agarosegel.

Tabelle 3.3 Ansätze Restriktionsverdau

Komponente	präparativ	analytisch
DNA	5-20 µg	0,5-1 µg
10x Reaktionspuffer	1x	1x
Restriktionsenzym	10 U	2-5 U
	20-40 µl	10 µl

3.1.3.3 Dephosphorylierung

Um die Religation der DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau zu vermeiden, werden die Phosphatgruppen an den 5' Enden der Vektor-DNA abgespalten. Dies geschieht durch Zugabe von 1 µl der thermosensitiven Alkalischen Phosphatase FastAP™ (1 U/µl) und 15-minütiger Inkubationszeit bei 37°C.

3.1.3.4 Ligation

Nach dem Aufschneiden von Vektor- und Insert-DNA mit komplementären Restriktionsendonukleasen können die Enden mithilfe einer T4-DNA-Ligase miteinander ligiert werden. DNA-Ligasen verbinden über die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung die 3'-Hydroxylgruppe mit der 5'-Phosphatgruppe eines DNA-Fragments. Zur Ligation werden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 gemischt, sowie 2 µl 10x Ligasepuffer und 2 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 14°C im Wasserbad inkubiert.

3.1.3.5 Transformation

Bei der durchgeführten Transformation erfolgt die Aufnahme von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterienzellen durch Hitzeschock. Die chemisch kompetenten Bakterien werden im Vorfeld durch die Calciumchloridmethode erzeugt und bei -80°C gelagert.

Transformation nach Ligation

Es werden 100 µl kompetente Bakterien (*E. coli* NEB5α, *E. coli* Top10F') mit 10 µl des Ligationsansatzes (10 µl) vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock des Ansatzes für 2 min bei 42°C im Wasserbad erfolgt eine einminütige Abkühlung auf Eis. Anschließend werden 450 µl SOC-Medium zugefügt und der Ansatz für 1 h bei 37°C

auf dem Schüttler (450 rpm) inkubiert. Nach dem Pelletieren der Bakterien (5000 rpm, 1 min) wird das Medium teilweise verworfen und das Pellet in den verbleibenden 50 µl resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird auf eine vorgewärmte Selektiv-Agarplatte (LB-Agar mit Ampizillin) ausgestrichen.

Quicktransformation

Die Quicktransformation wird durchgeführt, um Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien für eine Plasmid-Midipräparation zu gewinnen. Dafür wird der *E. coli* Stamm JM109 verwendet, der sich durch eine hohe Ausbeute an Plasmid-DNA bei geringerer Transformationseffizienz gegenüber den *E. coli* Stämmen NEB5α und Top10F' auszeichnet. Zu 50 µl der kompetenten Zellen werden jeweils 1 µl Plasmid-DNA zugefügt, der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert und anschließend auf vorgewärmte Selektiv-Agarplatten ausgestrichen.

3.1.4 DNA Analyse

3.1.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach Behandlung mit Restriktionsenzymen im Rahmen einer Klonierung bzw. eines Kontrollverlaufs zu analysieren, wird die DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierbei wandert die negativ geladene DNA innerhalb eines elektrischen Feldes in Anodenrichtung. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA ist durch die Agarose-Matrix umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekülgröße. Je nach Agarose-Konzentration können Fragmente von 0,1 bis 60 kb getrennt werden, wobei hohe Agarose-Konzentrationen zur Separierung sehr kleiner Fragmente und niedrige Konzentrationen zur Auftrennung sehr großer und zirkulärer DNA eingesetzt werden. Zur Herstellung werden 0,6 bis 2 % (w/v) Agarose (Biozym®) eingewogen, mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung wird diese mit 0,2 µg/µl Ethidiumbromid versetzt und in die Gelkammer gegossen.

Die Proben werden vor dem Auftragen mit 6x Ladepuffer vermischt und in die Probentassen gefüllt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wird zusätzlich ein DNA-Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Das Gel wird mit 1x TAE überschichtet und eine Spannung zwischen 20 und 120 V angelegt. Durch die Zugabe von interkalierendem Ethidiumbromid kann die DNA anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.1.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Anschließend können ausgewählte DNA-Banden unter schwachem UV-Licht herausgeschnitten werden. Die Eluierung der DNA-Fragmente erfolgt nach Herstellerangaben mit dem GENE CLEAN® Turbo Kit.

3.1.4.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration der Plasmid-DNA ist spektrometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm ermittelbar. Hierbei erfolgt die Messung mit dem UV/VIS Spektrophotometer NanoPhotometer™ (Implen) nach Herstellerangaben. Die Konzentration der DNA-Probe wird mit TE-Puffer auf 1,0 µg/ml eingestellt.

3.1.4.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der durch Klonierung hergestellten Plasmide erfolgt durch die Firma Eurofins MWG GmbH. Hierfür werden 100 ng/µl Plasmid-DNA und 15 pmol entsprechender Sequenzierprimer bereitgestellt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgt mit der DNA-Analyse Software MacVector und ApE (A plasmid Editor).

3.2 Proteinanalytische Methoden

3.2.1 Tricine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes nach Shägger und Jagow (1987) erfolgt in einem SDS-haltigen TRIS-Glycin-Puffersystem. Abhängig vom Acrylamidanteil und Vernetzungsgrad zwischen Acrylamid und Bisacrylamid liegt der Trennbereich bei 1-220 kDa.

Für die Auftrennung der Proteine wird in Abhängigkeit des Molekulargewichtes ein 7,5-15 %iges Trenngel in die Gelküvette gegossen und nach Polymerisation mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet. Die Polymerisation des Acrylamids erfolgt durch Zugabe des Polymerisationskatalysators TEMED (N, N, N', N' – Tetramethylethyldiamin) und des Radikalbilders APS (Ammoniumperoxydisulfat). Die Acrylamidfasern werden durch Bisacrylamid quervernetzt. Das auspolymerisierte Gel wird in die mit 1x Anodenpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und 500 ml 1x Kathodenpuffer in das Pufferreservoir gefüllt. Vor dem Beladen der Proben Taschen werden diese mit 1x Kathodenpuffer luftblasenfrei gespült. Die aufbereiteten Proteinproben (siehe Kapitel 3.3.3 und 3.4.1) werden für 5-10 min bei 95°C erhitzt und anschließend in die Taschen gefüllt. Der

Gellauf erfolgt über Nacht bei 20-25 mA pro Gel.

Tabelle 3.4 Zusammensetzung Tricine SDS-Polyacrylamidgele

	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 4 %
Rotiophorese Gel 30 (37,5:1)	7,5 ml	10 ml	15 ml	1,35 ml
Tricine-Gelpuffer	9,9 ml	9,9 ml	9,9 ml	2,5 ml
Glycerol	3,3 ml	3,3 ml	3,3 ml	-
Aqua dest.	9,3 ml			6,15 ml
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	10 µl
APS 10 %	300 µl	300 µl	300 µl	100 µl

3.2.2 Semi-dry Western Blot

Zur Detektion spezifischer Proteine wird das SDS-Gel mit einem „Semi-dry“-Blotter auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Auf die untere Anodenplatte werden zwei in Transferpuffer getränkte Whatman™-Filterpapiere gelegt. Eine in Transferpuffer vorinkubierte Nitrozellulosemembran (Amersham™ Hybond™-ECL Nitrozellulosemembran) bildet die nächste Schicht. Für kleine Proteine (≤ 10 kDa) findet eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ und 1x Transferpuffer ohne SDS oder 1x Transferpuffer mit 40 % Methanol Anwendung. Zum Transferieren größerer Proteine werden eine Membran mit $0,45\ \mu\text{m}$ Porengröße und 1x Transferpuffer (mit SDS) verwendet. Das Trenngel wird auf die Membran gelegt und mit weiteren zwei Lagen in Transferpuffer eingeweichem Filterpapier bedeckt. Nach dem Aufsetzen der Kathodenplatte erfolgt der Transfer bei $0,8\text{-}1,0\ \text{mA}/\text{cm}^2$ Gelfläche für 60 bis 90 min.

3.2.3 Immunologischer Nachweis

Im folgenden Schritt werden die Proteine auf der Membran durch Antikörperdetektion nachgewiesen. Zum Absättigen unspezifischer Bindestellen wird die Membran kurz in PBS-T gewaschen und anschließend für 1 h in Blockierungslösung inkubiert. Nach dem Blockieren wird die Membran erneut kurz in PBS-T gewaschen. Daraufhin wird der Primärantikörper (Tabelle 2.2), der spezifisch an das Epitop des Proteins bindet, für 1,5 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Durch dreimaliges Waschen zu je 10 min mit PBS-T werden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Anschließend erfolgt eine einstündige Inkubation der Membran mit einem horseradish peroxidase (HRP)-konjugiertem Sekundärantikörper. Um erneut unspezifische Bindungen zu vermeiden wird die Membran dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen. Die Detektion der HRP-konjugierten Antikörper erfolgt mit dem Immobilon™ Western Chemiluminescence HRP Substrate Kit

(Millipore) nach Herstellerangaben. Eine Inkubation der Membran mit dem Detektionsreagenz für 1-5 min führt zur Oxidation von Luminol durch HRP, wobei Photonen emittieren. Die Chemolumineszenz ist anschließend im Biolumager LAS 3000 (Fuji Film) zu detektieren.

3.2.4 Quenchen von Western Blot Membranen

Das Quenchen wird angewandt um weitere Proteine auf einer Nitrozellulosemembran nachzuweisen. Die Einschränkung der Methode besteht darin, dass der primäre Antikörper des zweiten immunologischen Nachweises notwendigerweise aus einer anderen Wirtsspezies stammen muss, da lediglich die Aktivität der HRP inhibiert wird und der primäre und sekundäre Antikörper gebunden bleibt.

Hierbei wird die Membran nach der Detektion in PBS-T gewaschen und drauffolgend für 30 min in 5 %iger Natriumazid-Lösung geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen zu je 10 min mit PBS-T kann mit der Inkubation des zweiten primären Antikörpers, wie in Punkt 3.2.3 beschrieben, fortgefahren werden.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für die Untersuchungen wurden die humanen Zelllinien HT1080, HT1080 PLNE und 293T in 75 cm² oder 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Im Hinblick auf gute physiologische Bedingungen werden die Zelllinien im Brutschrank bei 37°C und automatischer CO₂ Begasung von 5 % CO₂ inkubiert und der erforderliche Gasaustausch durch die Verwendung von Zellkulturflaschen mit gaspermeablen Filterdeckeln gewährleistet.

Ist die Wachstumsfläche lückenlos mit kultivierten Zellen bedeckt, d.h. konfluent, so sinkt durch eine zu hohe Zelldichte die Proliferationsrate stark ab. Zweimal wöchentlich erfolgt deshalb zur Vorbeugung der Proliferationshemmung das Passagieren der Zellen. Dabei werden die Zellen aus dem Monolayer herausgelöst, in Suspension gebracht und erneut in ein Kulturgefäß überführt. Dadurch können die Zellen in einem teilungsfähigen Zustand gehalten werden. Entstandene toxische Stoffwechselprodukte werden durch einen Mediumwechsel entfernt und ein eventueller Nährstoffmangel beseitigt.

Zum Passagieren der Zellen werden, nach der Abnahme des Mediums, die Zellen mit PBS gewaschen, um nicht haftende Zellen zu entfernen. Das Ablösen der Zellen geschieht anschließend durch die Zugabe von Trypsin/EDTA. Nach 2-5 min Inkubationszeit bei 37°C sind die Zellen vollständig abgelöst und der Vorgang wird durch Zugabe von neuem Medium gestoppt. Nach dem Resuspendieren wird die Zellsuspension gesplittet

und die entsprechende Menge Medium zugegeben. Je nach Zelldichte erfolgt ein Splitten der Zellen von 1:10 bis 1:20. Die verbleibende Menge Zellsuspension kann zur Zellzählung und Aussaat genutzt werden. Die Zellzahl wird mittels Neubauer-Zählkammer nach Formel (1) berechnet.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \left(\sum \frac{\text{gezählte Zellen}}{4 \text{ Quadrate}} \right) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \quad (1)$$

3.3.2 Transfektion von 293T Zellen mit Polyethylenimin

Diese Methode findet Anwendung bei der Gewinnung von Zellüberständen für Infektionsversuche und Partikelpräparationen. Die Transfektion von Plasmid-DNA in 293T Zellen erfolgt mit dem Transfektionsreagenz PEI. PEI ist ein kationisches Polymer mit nukleinsäurebindenden und –kondensierenden Eigenschaften. Der sich bildende Komplex kann von vielen Zellarten effizient aufgenommen werden. Da verzweigtes PEI als Chemikalie erhältlich ist, stellt es eine kostengünstige Transfektionsvariante dar.

Hierbei werden am Tag vor der Transfektion 5×10^5 293T Zellen/ml in 10 cm Schalen eingesät, mit einem Gesamtvolumen von 10 ml und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ Begasung im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wird ein Mediumwechsel der Schalen mit 4 ml 15 % DMEM durchgeführt. Für die Transfektion werden die PEI-Lösung und die DNA-Lösung nach den Angaben der Tabelle 3.5 hergestellt, zusammenpipettiert und 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsmix wird anschließend vorsichtig auf die Zellen gegeben und die transfizierten Schalen bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 3.5 PEI-Transfektionsmix

	DMEM	Zusatz
PEI-Lösung	955 µl	45 µl PEI
DNA-Lösung	984 µl	16 µg DNA

Am darauffolgenden Tag wird der Ansatz von den Schalen abgesaugt und mit 5 ml DMEM (komplett) ersetzt. Anschließend erfolgen die Ernte des Zellkulturüberstands zur Partikelpräparation, der Infektion von Zielzellen und die Lyse der Zellen.

3.3.3 Herstellung von Zelllysaten

Zur Analyse der intrazellulären Genexpression werden transfizierte 293T Zellen lysiert, die Zellproteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und immunologisch nachgewiesen. Die Herstellung der Zelllysate erfolgt mit der Methode der milden Lyse, sowie mit QIAshredder™-Säulen (Qiagen).

Der in 10cm Schalen befindliche Zellkulturrasen wird mit 1x PBS gewaschen, anschließend mit 600 µl 1x Lysepuffer versetzt und für mindestens 20 min bei 4°C inkubiert. Das enthaltene Triton® X-100 bewirkt die Permeabilisierung der Zytoplasmamembran und die Solubilisierung der zytoplasmatischen Proteine. Die Zellen werden danach mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgelöst und auf eine QIAshredder™-Säule überführt. Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min) wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, die Säulen mit 600 µl 2x PPC versetzt und durch erneutes Zentrifugieren (13.000 rpm, 1 min) gespült. Nach Vereinigung der beiden Eluate werden die Proteinproben zur vollständigen Denaturierung für 10 min auf 95°C erhitzt und anschließend bei -20°C gelagert.

3.3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren mit dem Zellpopulationen hinsichtlich ihrer physikalischen und anderer Eigenschaften charakterisiert werden können. In einem Mikrokanal fließen die Zellen vereinzelt an einem Laserstrahl entlang. Die Emission des Streulichtes wird von einem Detektionssystem erfasst. Daraus sind Informationen über Zellgröße, Granularität und Membranstruktur der Zellen ableitbar. Folglich sind auch verschiedene Zellpopulationen unterscheidbar. Ebenso lässt sich die Expression fluoreszierender Markerproteine untersuchen. Im Fall des verwendeten Fluorochrom eGFP (enhanced green fluorescent protein) werden die Zellen mit 488 nm angeregt, um eine Emission bei 509 nm zu detektieren. Über die quantitative Bestimmung des Markergens eGFP kann auf den Anteil infizierter Zellen geschlossen werden. Durch die Rate infizierter Zellen berechnet sich nach folgender Formel der Titer an infektiösen Viren:

$$Titer = -2\ln \times \left(1 - \left(\frac{\%eGFP - mock}{100}\right)\right) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Zellzahl} \quad (2)$$

%eGFP: Prozentsatz an eGFP exprimierenden Zellen
mock: Negativkontrolle, die kein eGFP exprimiert, wird auf einen Wert von 0,03 % festgesetzt
Nur Werte die >3x mock und <80 % sind gehen in die Titerberechnung ein

Zur Analyse erfolgt die Abnahme des Mediums von den infizierten Zellen im 12-Well-Format, das Waschen der Zellen mit PBS und das anschließende Ablösen der Zellen von der Oberfläche durch Zugabe von 200 ml Trypsin-EDTA. Die Zellen werden in 1 ml DMEM (komplett) resuspendiert, in FACS-Röhrchen transferiert und durch Zentrifugation (1200 rpm, 5 min) pelletiert. Der Überstand wird abgekippt und die Zellen in PBS resuspendiert. Bei der Arbeit mit proviralem Material müssen die Zellen zusätzlich durch die Zugabe von 200 µl 6 %iger Formaldehydlösung für 30 min bei 4°C fixiert werden. Daraufhin werden die Zellen erneut pelletiert, der Überstand verworfen, in 200 µl PBS resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C gelagert. Die Proben werden mit dem FACS-Calibur (Becton-Dickinson) analysiert und mittels der Software CellQuest ausgewertet.

3.4 Virologische Methoden

3.4.1 Partikelpräparation aus Zellkulturüberständen

Zunächst werden die virushaltigen Zellkulturüberstände, wie in Punkt 3.3.2 beschrieben, gewonnen und 48 h nach der Transfektion der 293T Zellen mit einer Einwegspritze abgenommen. Die Abtrennung der extrazellulären Viruspartikel erfolgt über Dichtegradientenzentrifugation. Dafür wird 20 %ige Sucrose in Zentrifugenröhrchen vorgelegt und der Zellkulturüberstand durch einen Sterilfilter (0,45 µm) vorsichtig auf das Sucrosekissen geschichtet.

Tabelle 3.6 Ansatz Ultrazentrifugation

Volumen Zellkulturüberstand	Ultrazentrifugenröhrchen (Typ)	Volumen Sucrose (20 %)	nächster Analyseschritt
10 ml	SW 32	2 ml	immunologischer Nachweis
30 ml	SW 28	5 ml	Subtilisinverdau

Die Zentrifugation des Ansatzes (Tabelle 3.6) wird in einer Optima L-60 Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter) für 2 bis 3 h bei 25.000 rpm und 4°C vorgenommen. Virale Partikel liegen anschließend in einem Pellet vor, wohingegen der Überstand lösliche Proteine enthält. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in PBS resuspendiert. Bei darauffolgender Proteinanalyse in einer SDS-PAGE werden die pelletierten viralen Partikel in 50 µl PBS und 50 µl 2x PPC gelöst und der Ansatz für 10 min bei 95°C gekocht. Bis zur Verwendung erfolgt die Lagerung bei -20°C. Alternativ zum sofortigen immunologischen Nachweis kann zuvor ein Proteaseverdau der viralen Partikel durchgeführt werden, um nicht Partikel-assoziierte, pelletierte Proteine zu entfernen. Dafür wird das Pellet nach der

Ultrazentrifugation in 134 μ l PBS, für einen jeweils positiven und negativen Subtilisinverdauansatz, aufgenommen.

Tabelle 3.7 Ansatz Subtilisinverdau

Komponente	Ansatz mit Subtilisin	Ansatz ohne Subtilisin
virale Partikel	66,75 μ l	66,75 μ l
Subtilisin (0,5 mg/ml)	3,75 μ l	-
PBS	-	3,75 μ l
CaCl ₂ (0,1 M)	0,75 μ l	0,75 μ l
Tris/HCl (1 M, pH 8,0)	3,75 μ l	3,75 μ l
	75 μ l	75 μ l

Die Ansätze werden nach Tabelle 3.7 vorbereitet und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Protease-Aktivität durch Zugabe von 1 μ l Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) inaktiviert. Nach 2 min Inkubationszeit werden die Proben mit 75 μ l 2x PPCP versetzt, 10 min bei 95°C erhitzt und bis zur immunologischen Analyse bei -20°C gelagert.

3.4.2 Infektion von Wirtszellen

Zur Ermittlung der Infektiosität der verwendeten viralen Partikel werden HT1080 oder HT1080 PLNE Zellen eingesetzt. HT1080 Zellen finden Anwendung bei der Infektion mit replikationsdefizienten Viren und HT1080 PLNE Zellen bei der Infektion mit replikationskompetenten Viren. Die Gewinnung der replikationsdefizienten Virusvektoren erfolgt im 4-Komponenten-Vektorsystem. Der eingebrachte Transfervektor enthält das Markergen eGFP, dessen Fluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen wird. Die Gewinnung replikationskompetenter Viren erfolgt hingegen mittels eines proviralen Expressionskonstruktes. Das eGFP-Markergen liegt in diesem Fall integriert im Genom der Zielzellen HT1080 PLNE vor. Das Markergen unterliegt der Kontrolle des LTR-Promotors, der bei Bindung des foamyviralen Tas-Proteins aktiviert wird. Bei der Infektion von Zellen mit Tas-exprimierenden Viren ist die durchflusszytometrische eGFP-Messung möglich.

Für die Infektion werden $2,0 \times 10^4$ Zellen/ml in einem 12-Well-Format eingesät und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nachfolgenden Tag wird das Medium abgesaugt, 1 ml der Zellkulturüberstände (siehe Kapitel 3.3.2) zugegeben und bei 37°C inkubiert. Die Virusüberstände werden in folgenden Verdünnungsstufen eingesetzt: unverdünnt, 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} . Nach 4-6 h Inkubationszeit erfolgt ein Medienwechsel mit 1 ml DMEM (komplett). Die Infektionsanalyse (Kapitel 3.3.4) erfolgt nach 24 h unter Anwendung von HT1080 PLNE Zellen und nach 72 h bei Anwendung von HT1080 Zellen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Klonierung eines HA- bzw. eGFP-getaggten PFV Gag p3 Expressionskonstruktes

Bezüglich der Zielstellung zur Untersuchung des Einflusses von PFV p3^{Gag} auf die Bildung viraler Partikel wurden zunächst PFV p3^{Gag}-Fusionskonstrukte hergestellt und anschließend für Infektions- und biochemische Analysen eingesetzt.

Als Grundlage für die Herstellung der PFV Fusionskonstrukte pcoPG4p3 CHA und pcoPG4p3 CeGFP (Abbildung 4.1) wurden die Expressionsplasmide pcoPG4 CHA und pcoPG4 CeGFP verwendet. Die Ausgangsvektoren sind jeweils C-terminal mit einem *egfp*-Gen oder *ha*-Tag fusioniert. Zwischen dem *ha*- bzw. *egfp*-ORF und dem p3^{Gag}-Konstrukt sorgt ein Glycin-Serin-Linker für Flexibilität zwischen beiden Domänen. Diese Gag-Fusionskonstrukte basieren auf dem expressionsoptimierten PFV Gag-Expressionsplasmid pcoPG4 (Abbildung 4.1 PG wt) und lagen bereits kloniert vor.

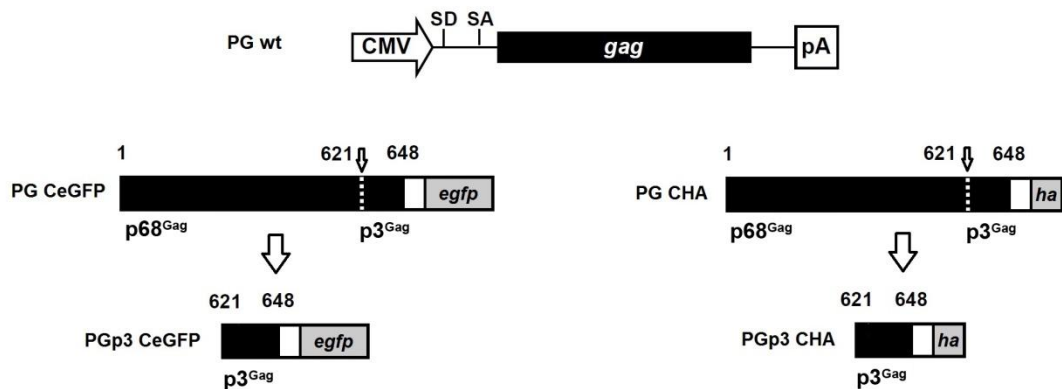


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der PFV p3^{Gag}-Fusionskonstrukte

Die Herstellung der PFV p3^{Gag}-Fusionskonstrukte erfolgt aus bereits getaggten Gag-Fusionskonstrukten, wobei die Gag p68/p3 Prozessierungsstelle als gestrichelte Linie gekennzeichnet ist. Die HA- und eGFP-kodierenden Sequenzen liegen C-terminal und sind durch graue Boxen dargestellt. Die flexibilitätsvermittelnden Glycin-Serin-Linker sind als weiße Boxen abgebildet. PG - PFV Gag; wt - Wildtyp; CMV - „cytomegalovirus immediate-early promotor“; SD - Spleißdonor; SA - Spleißakzeptor; pA - Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons; egfp - „enhanced green fluorescent protein“, ha - Hämagglutinin.

Die um die PFV p68^{Gag}-Domäne verkürzten p3^{Gag}-Fusionskonstrukte wurden so gestaltet, dass nur jeweils ein Start-Codon (ATG) und ein Stop-Codon (TGA) im gesamten ORF vorlagen. Die Klonierung der Konstrukte pcoPG4p3 CHA (p3HA) und pcoPG4p3 CeGFP (p3GFP) wurde nach der Strategie in Tabelle 4.1 durchgeführt. Zunächst erfolgte die Öffnung der jeweiligen Ausgangsvektoren mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* und

eine Dephosphorylierung zur Vermeidung einer Religation mit FastAP™. Das Insert entstand aus einer mutagenen PCR, die ein Start-Codon generierte.

Tabelle 4.1 Klonierungsstrategien der PFV p3^{Gag}-Fusionskonstrukte pcoPGp3 CHA und pcoPGp3 CeGFP

Konstrukt	Ausgangsplasmid	PCR-Primer	Restriktionsverdau	Erhaltenes Fragment (bp)
pcoPG4 p3CHA				
Vektor	pcoPG4 CHA		<i>EcoRI/NotI</i> FastAP™	6512
Insert	pcoPG4 CHA	916/ 3378	<i>EcoRI/NotI</i>	172
pcoPG4 p3CeGFP				
Vektor	pcoPG4 CeGFP		<i>EcoRI/NotI</i> FastAP™	6512
Insert	pcoPG4 CeGFP	916/ 3378	<i>EcoRI/NotI</i>	859

Nach der Ligation erfolgte die Transformation der Plasmide in den *E. coli* Stamm Top10F' oder NEB5 α . Nach einer Minipräparation wurden positive Klone durch Kontrollverdau mit dem Enzym *SmaI* ermittelt. Diese wurden in *E. coli* JM109 umtransformiert und die durch Midipräparation isolierten Plasmide sequenziert.

4.2 Biochemische Charakterisierung der zellulären Proteinexpression und Infektionsanalyse der freigesetzten Partikel basierend auf Koexpression des PFV Gag p3HA- bzw. p3GFP-Fusionskonstrukte im PFV 4-Komponenten-Vektorsystem

Ein Teil der Masterarbeit stellte die Untersuchung des Einflusses der Expression von p3^{Gag}-Proteinen im PFV 4-Komponenten-Vektorsystem auf die Bildung infektiöser Viruspartikel dar. Hütter et al. diskutierten, ob die PFV p3^{Gag}-Domäne nach Prozessierung des p71^{Gag}-Vorläuferproteins eine stimulierende Wirkung auf die intrapartikuläre reverse Transkription der viralen RNA in DNA und auf die Infektiosität ausüben könnten (Hütter et al., unveröffentlicht). Zur Beurteilung des Effektes des PFV p3^{Gag}-Proteins wurde die Wirkung auf die zelluläre Expression und die Infektiosität der freigesetzten Partikel geprüft. Die Untersuchung der Wirkung von p3^{Gag} erfolgte zur umfassenden Analyse in unterschiedlichen expressionsoptimierten PFV 4-Komponenten-Vektorsystemen. Das PFV 4-Komponenten-Vektorsystem besteht aus drei Verpackungskonstrukten und einem Trans-

fervektor, die zur Bildung replikationsdefizienter Viruspartikel notwendig sind. Einerseits kam das wildtypische 4-Komponenten-Vektorsystem zum Einsatz. Das PFV Gag Verpackungskonstrukt kodiert für das p71^{Gag}-Vorläuferprotein, welches Protease-vermittelt in seine funktionellen Einheiten p68^{Gag} und p3^{Gag} prozessiert wird. Andererseits wurde der Einfluss im modifizierten p68^{Gag} (p68) 4-Komponenten-Vektorsystem betrachtet. Das System kennzeichnet sich durch ein Verpackungskonstrukt für PFV Gag aus, das nur über die verkürzte p68^{Gag}-Domäne verfügt und in allen Fällen nur zur Expression des p68^{Gag}-Spaltproduktes führt. Hütter et al. konnten eine 10-fach verminderte Infektiosität gebildeter viraler Partikel gegenüber der wildtypischen Viruspartikel beobachten (Hütter et al., unveröffentlicht). Weiterhin wurde der Einfluss des PFV p3^{Gag}-Proteins auf das zelluläre Expressionslevel der viralen Proteine und die Infektionsergebnisse im modifizierten Pol iPR (iPR) 4-Komponenten-Vektorsystem untersucht. Das PFV Pol-Verpackungskonstrukt verfügt hier über eine enzymatisch inaktive Protease-Domäne. Die für die Bildung infektiöser Partikel essentielle Gag-Prozessierung findet demnach nicht statt. Zur Funktionsanalyse des p3^{Gag} wurde weiterhin das p68^{Gag}/Pol iPR (p68-iPR) 4-Komponenten-Vektorsystem eingesetzt. Das System ist eine Kombination der beiden vorher genannten und zeichnet sich durch PR-inaktive Pol-Konstrukte in Kombination mit prozessiertem PFV p68^{Gag} aus. Die Viren sind gegenüber den viralen Partikeln aus dem wildtypischen (wt) 4-Komponenten-Vektorsystem 100-fach weniger infektiös (Hütter et al., unveröffentlicht). In Tabelle 4.2 sind die verwendeten Konstrukte der jeweiligen 4-Komponenten-Vektorsysteme sowie deren DNA-Verhältnis im System zueinander dargestellt. Das DNA-Verhältnis der drei Verpackungskonstrukte Gag, Pol und Env und dem Transfervektor beträgt in den durchgeführten Experimente 4:2:1:28. Die Gesamtmenge der transfizierten DNA ergibt pro Ansatz jeweils 16 µg.

Tabelle 4.2 Verwendete Plasmide des expressionsoptimierten PFV 4-Komponenten-Vektorsystems

Bezeichnung des 4-Komponenten-Vektorsystems	Plasmide
Wildtyp (wt)	pcoPG4, pcoPP, pcoPE, puc2MD9
p68	pcoPG4 1-621, pcoPP, pcoPE, puc2MD9
iPR	pcoPG4, pcoPP1(iPR), pcoPE, puc2MD9
p68-iPR	pcoPG4 1-621, pcoPP1(iPR), pcoPE, puc2MD9

Zur Funktionsanalyse des p3^{Gag} im PFV 4-Komponenten-Vektorsystem diene die Transfektion der Konstrukte des 4-Komponenten-Vektorsystems ohne p3HA als Referenzprobe des gesamten Experiments im jeweilig untersuchten System.

In einem ersten Experiment wurde das p3HA-Fusionskonstrukt in gleicher Menge zu den Gag-Konstrukten des 4-Komponenten-Vektorsystems eingesetzt. Hierbei reduzierte sich die Menge des eingesetzten Transfervektors, sodass das Verhältnis der transfizierten Konstrukte p3HA:Gag:Pol:Env:Transfervektor folglich 4:4:2:1:24 betrug. Allerdings konnte kein Effekt auf den infektiösen Titer verzeichnet werden, weshalb auf die Darstellung der Infektionsdaten und der biochemischen Analyse verzichtet wurde. Um auszuschließen, dass die Menge an kotransfizierten p3^{Gag}-Konstrukten zu gering war, wurde das Verhältnis transfizierter Vektoren neu angepasst und die Menge des transfizierten p3^{Gag}-Expressionsplasmids drastisch erhöht. In allen folgenden Untersuchungen der gebildeten Viruspartikel und der zellulären Expression wurden die p3^{Gag}-Konstrukte in vier verschiedenen Verhältnissen mit dem 4-Komponenten-Vektorsystem kotransfiziert. Zu dem im üblichen Verhältnis eingesetzten PFV 4-Komponenten-Vektorsystem (Tabelle 4.2) wurden die Konstrukte p3HA oder p3eGFP in den DNA-Verhältnissen von 1:1, 1:3, 1:7 oder 1:15 in die 293T Zellen kotransfiziert (Tabelle 4.3). Die DNA-Menge der p3^{Gag}-Konstrukte verdoppelt sich hierbei schrittweise, wohingegen die DNA-Menge des 4-Komponenten-Vektorsystems entsprechend reduziert wird. Um den Einfluss des p3^{Gag}-Proteins auf das zelluläre Expressionslevel und die Infektionsergebnisse zu beurteilen, wurden für alle Transfektionsverhältnisse anstatt mit einem Konstrukt für p3^{Gag} auch Proben mit pUC19 kotransfiziert. Die Kotransfektion des Leervektors pUC19 diene somit als interne Kontrolle innerhalb eines transfizierten Verhältnisses, damit der Einfluss des p3^{Gag}-Proteins in einzelnen Verdünnungsstufen charakterisiert werden kann. Die alleinige Transfektion des Plasmids pUC19 diene der Negativkontrolle.

Tabelle 4.3 Verhältnis der verwendeten Plasmide des PFV 4-Komponenten-Vektorsystems zu den kotransfizierten Konstrukten für Infektions- und biochemische Analysen

Bezeichnung	DNA Verhältnis	
	4-Komponenten-Vektorsystem	p3HA/p3eGFP/pUC19
wt/p68/iPR/p68-iPR -4-Komponenten-Vektorsystem	1 (16 µg)	0
1:1	1 (8 µg)	1 (8 µg)
1:3	1 (4 µg)	3 (12 µg)
1:7	1 (2 µg)	7 (14 µg)
1:15	1 (1 µg)	15 (15 µg)

Mit den vorgestellten 4-Komponenten-Vektorsystemen wt, p68, iPR und p68-iPR wurden in einzelnen Experimenten Infektions- und biochemische Analysen durchgeführt, um die Wirkung des transfizierten p3^{Gag}-Konstruktes zu beurteilen. Alle Ansätze wurden nach dem bereits beschriebenen Schema in Tabelle 4.3 hergestellt.

Für die Infektionsanalysen der gebildeten Viruspartikel und die Charakterisierung der zellulären Expression wurden die Konstrukte des 4-Komponenten-Vektorsystems in 293T Zellen transfiziert und je nach Ansatz mit p3^{Gag}-Konstrukten oder pUC19 in den Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15 kotransfiziert. Zur Charakterisierung der zellulären Proteinexpression der 293T Zellen wurden die Zelllysate, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, hergestellt. Die enthaltenen Proteine wurden mittels Tricine SDS-PAGE (Kapitel 3.2.1) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Kapitel 3.2.2). Anschließend erfolgte der immunologische Nachweis (Kapitel 3.2.3) der viralen Proteine Gag, Pol und Env unter Verwendung spezifischer Antikörper. Zudem wurde das GAPDH-Protein detektiert, das als Ladekontrolle für intrazellulär exprimierte Proteine diente. Eine gleichmäßige Expression soll die Verwendung gleichmäßig aufgetragener Probenmengen bestätigen.

Zur Analyse der Infektiosität gebildeter viraler Partikel wurde von den transfizierten 293T Zellen der zellfreie Virusüberstand gewonnen und HT1080 Zellen in einer seriellen Verdünnung von 10^0 bis 10^{-3} infiziert. Nach 72 h erfolgte die durchflusszytometrische Messung der eGFP-positiven Zellen zur Berechnung des infektiösen Titers.

Soweit nicht anders vermerkt, erfolgte jeweils eine zweimalige Durchführung der Experimente. Eine statistische Signifikanzanalyse der Resultate ist erst ab drei Experimenten möglich. Allerdings können durch die doppelte Durchführung der Experimente bereits Tendenzen festgestellt werden.

In den folgenden Abschnitten sind die biochemische Charakterisierung der zellulären Proteinexpression und die Ergebnisse der Infektionsanalyse ausführlich dargestellt und erläutert.

4.2.1 Wildtypisches 4-Komponenten-Vektorsystem

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Wirkung von p3^{Gag} auf die zelluläre Proteinexpression und die Infektionseignisse im PFV wt-4-Komponenten-Vektorsystem. Das System wurde als Referenz zu der Betrachtung der modifizierten 4-Komponenten-Vektorsysteme eingesetzt und sollte einen ersten Überblick geben. Zur Funktionsanalyse des PFV p3^{Gag} erfolgte die Transfektion der Konstrukte wie im vorherigen Abschnitt (Kapitel 4.2, Tabelle 4.3) beschrieben.

Abbildung 4.2 zeigt die Analyse der zellulären Proteinexpression anhand eines repräsentativen Western Blots. Zur Detektion der Gag- und Env-Proteine wurden die PFV spezifischen AK α -PFV Gag und α -PFV Env-LP eingesetzt. In allen Proben außer der Negativ-

kontrolle konnten sowohl das p71^{Gag}-Vorläuferprotein (71 kDa), als auch das prozessierte p68^{Gag}-Spaltprodukt (68 kDa) detektiert werden (Abbildung 4.2 A, Spuren 1-9). Das Env-Vorläuferprotein (130 kDa) konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 4.2 A, Spuren 1-9). Die Prozessierung des Vorläuferproteins findet während des intrazellulären Transports durch furinähnliche Proteasen in die Untereinheiten LP (18 kDa) und SU (80 kDa) statt. Der eingesetzte, an die LP-Untereinheit bindende, Env-LP AK kann neben dem Env-Vorläuferprotein die glykosylierten gp18^{LP} und ubiquitinierten Formen gp28^{LP} und gp38^{LP} detektieren. Im vorliegenden Zelllysate konnte die Untereinheit gp18^{LP} nachgewiesen werden (Abbildung 4.2 A, Spuren 1-9). Die Analyse mittels Pol AK zeigte in allen Proben den p127^{Pol}-Vorläufer sowie die prozessierten Untereinheiten p85^{PR/RT} und p40^{IN} (Abbildung 4.2 B, Spuren 1-9).

Die zellulären Expressionslevel der Ansätze mit kotransfizierten p3HA-Konstrukten wiesen im Vergleich zu den verhältnismäßigen Ansätzen mit pUC19 eine abgeschwächte Expression aller Vorläuferproteine und prozessierten Spaltprodukte auf (Abbildung 4.2, Spuren 2 zu 3; 4 zu 5; 6 zu 7; 8 zu 9). Die inhibierende Wirkung des p3^{Gag}-Proteins auf die zelluläre Proteinexpression trat in den Proben mit höher transfizierten Mengen des p3^{Gag}-Konstruktes (1:7 und 1:15) besonders deutlich auf (Abbildung 4.2, Spuren 6 zu 7; 8 zu 9). Das Zelllysate der Referenzprobe wt zeigte erwartungsgemäß das stärkste Expressionssignal (Abbildung 4.2, Spur 1). Im Allgemeinen war sowohl für die Proben mit kotransfiziertem pUC19 als auch mit p3HA-Konstrukten, aufgrund der sich schrittweise halbierenden DNA-Menge transfizierter Konstrukte des PFV 4-Komponenten-Vektorsystems, ein abnehmender Gehalt der Expressionsstärke viraler Proteine feststellbar (Abbildung 4.2, Spuren 1-9).

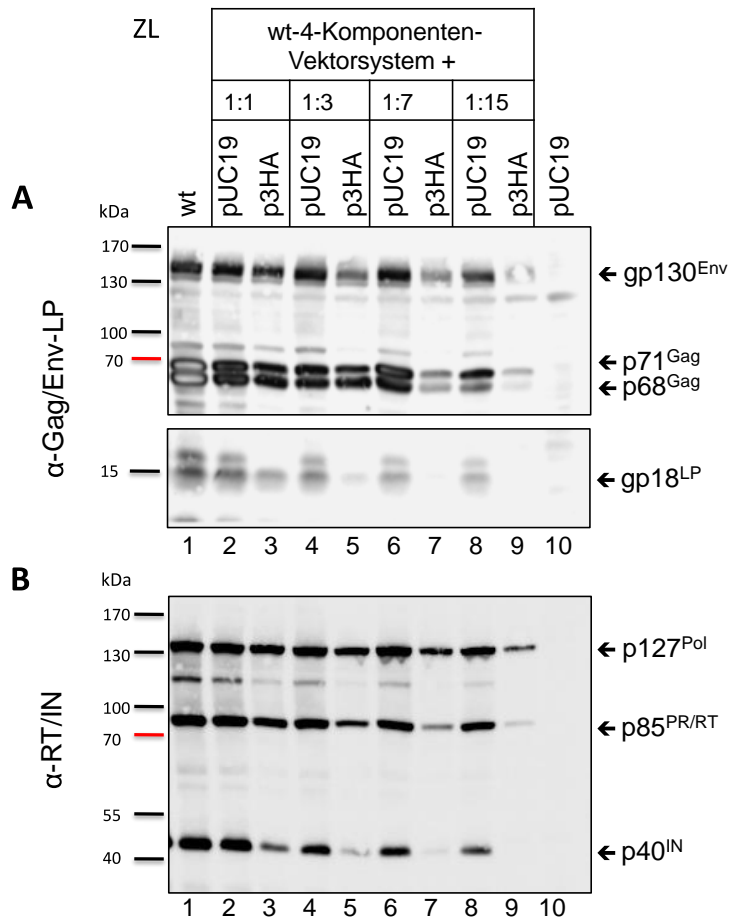


Abbildung 4.2 Biochemische Analyse der zellulären Proteinexpression basierend auf der Kotransfektion des PFV 4-Komponenten-Vektorsystems mit dem p3HA-Fusionskonstrukt in 293T Zellen

Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot der zellulären Expression nach Kotransfektion der PFV Expressionskonstrukte. 293T Zellen wurden einerseits mit dem wildtypischen PFV 4-Komponenten-Vektorsystem (Spur 1) transfiziert. Das PFV wt-4-Komponenten-Vektorsystem setzt sich aus den expressionsoptimierten Konstrukten pcoPG4, pcoPP, pcoPE und puc2MD9 zusammen. Andererseits wurde neben dem 4-Komponenten-Vektorsystem das Fusionskonstrukt pcoPGp3 CHA oder als Referenz der Leervektor pUC19 kotransfiziert. Dies erfolgte in den Verhältnissen 1:1 (Spuren 2 und 3), 1:3 (Spuren 4 und 5), 1:7 (Spuren 6 und 7) und 1:15 (Spuren 8 und 9). Das Plasmid pUC19 diente als Negativkontrolle. Die aufbereiteten Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, wobei je 40 µl Zelllysate (ZL) auf ein 7,5 %iges Gel aufgetragen wurden. Anschließend erfolgten der Transfer der Proteine (180 mA, 90 min) und die immunologische Detektion der zellulären Proteinexpression. A) Für die Detektion der Gag- und Env-Proteine wurden der PFV Gag-spezifische AK (α-PFV Gag936 1:1000) und der PFV Env-LP-spezifische AK eingesetzt (α-PFV Env-LP 1:200). B) Der Nachweis der Pol-Proteine erfolgte mit α-PFV RT (1:400) und α-PFV IN (1:100).

Für die Infektionsanalyse der gebildeten viralen Partikel wurde aus zwei unabhängigen Experimenten der Mittelwert gebildet. Die ermittelten relativen infektiösen Titer sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Die Infektiosität der aus dem wt-4-Komponenten-Vektorsystem hervorgegangenen Partikel der Referenzprobe ohne Kotransfektion von pUC19 oder p3HA-Konstrukten wurde auf 100 % gesetzt (Abbildung 4.3, wt, schraffierte Säule).

Erwartungsgemäß konnte eine abnehmende Infektiosität des wt-4-Komponenten-Vektorsystems bei Viren, basierend auf geringerer transfizierter DNA-Mengen, verzeich-

net werden (Abbildung 4.3, schwarze Säulen). Allerdings sank die Infektionsrate nicht proportional mit der transfizierten Menge des 4-Komponenten-Vektorsystems von 50 % auf 25 %, auf 12,5 %, auf 6,7 %. Die Kotransfektion des p3HA-Konstruktes bewirkte in den Verhältnissen 1:1 und 1:3 eine Steigerung der Infektiosität (Abbildung 4.3, 1:1 und 1:3). Im Verhältnis 1:1 übertraf der infektiöse Titer sogar das Niveau der Referenzprobe wt (Abbildung 4.3, 1:1).

Zur Verdeutlichung des Effektes der transfizierten p3HA-Konstrukte auf die Infektiosität freigesetzter Viruspartikel innerhalb der einzelnen Ansätze, wurde in Tabelle 4.4 der Faktor an Infektionszunahme in den einzelnen DNA-Verhältnissen dargestellt (Tabelle 4.4, 1:1-1:15). Dabei dienten die Proben mit kotransfiziertem pUC19 als Referenzwert. Das transfizierte p3^{Gag}-Konstrukt zeigte hierbei im DNA-Verhältnis 1:3 den stärksten Einfluss auf Infektiosität der viralen Partikel. Der infektiöse Titer erfuhr eine etwa 2-fache Erhöhung (Tabelle 4.4, 1:3). Einen ähnlichen Effekt zeigte das DNA-Verhältnis 1:1 mit einem 1,5-fach erhöhten Titer (Tabelle 4.4, 1:1). Für höher transfizierte Mengen von p3HA zeigte sich ein negativer Effekt auf die Infektiosität (Abbildung 4.3, 1:7 und 1:15). Sie sank gegenüber dem Referenzwert mit kotransfiziertem pUC19 um 50 % für das Verhältnis 1:7 und um 90 % für das Verhältnis 1:15 (Tabelle 4.4, 1:7-1:15).

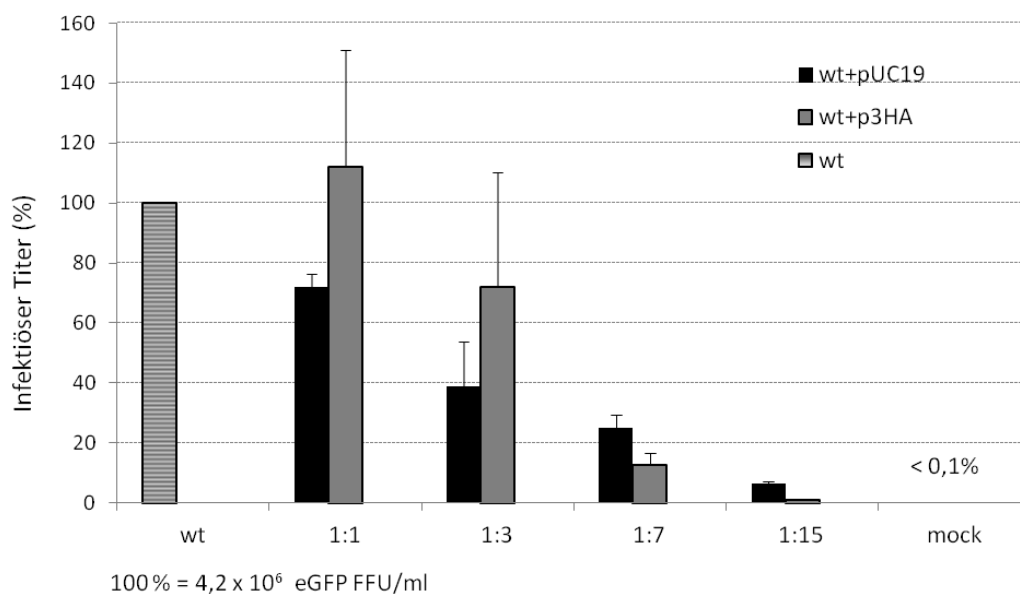


Abbildung 4.3 Relative Infektiosität der aus dem wt-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3HA-Konstrukten entstandenen Viruspartikel

Infektiöse Partikel entstanden nach Transfektion der 293T Zellen mit dem PFV 4-Komponenten-Vektorsystem. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen infektiösen Virustiter aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden in Bezug auf das wt-4-Komponenten-Vektorsystem berechnet, das 100 % gesetzt wurde. Das PFV 4-Komponenten-Vektorsystem setzt sich aus den expressionsoptimierten Konstrukten pcoPG4, pcoPP, pcoPE und puc2MD9 zusammen. Das pcoPGp3 CHA-Fusionskonstrukt wurde mit den Konstrukten des 4-Komponenten-Vektorsystems in den Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15 kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente pUC19. Die Messung im Durchflussszytometer erfolgte 72 h nach Infektion der HT1080 Zellen.

Tabelle 4.4 Vergleich der relativen Infektiosität der im kotransfizierten PFV wt-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3HA-Konstrukten entstandenen Viruspartikel

Die Infektiosität des mit pUC19 kotransfizierten wt-4-Komponenten-Vektorsystems wurde für jedes DNA-Verhältnis auf 100 % gesetzt. Das DNA-Verhältnis gibt das Verhältnis der transfizierten Plasmid-DNA an.

Verhältnis Konstrukte A:B		1:1	1:3	1:7	1:15
Konstrukte					
A) 4-Komponenten-Vektorsystem	B)				
wt	pUC19	1 (100 %)	1 (100 %)	1 (100 %)	1 (100 %)
wt	p3HA	1,5	1,8	0,5	0,1

4.2.2 Modifiziertes p68^{Gag}-4-Komponenten-Vektorsystem

Die Untersuchung der Wirkung von p3^{Gag} auf die zelluläre Proteinexpression und die Infektionsergebnisse erfolgte zudem im PFV p68-4-Komponenten-Vektorsystem. Die Transfektion der Konstrukte wurde, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, durchgeführt (Kapitel 4.2.1, Tabelle 4.3). Für die Funktionsanalyse des PFV p3^{Gag} wurden in dem Experiment einerseits das p3HA-Konstrukt, andererseits das p3GFP-Konstrukt eingesetzt. Abbildung 4.4 stellt die biochemische Analyse der zellulären Proteinexpression anhand eines repräsentativen Western Blots dar. Die Analyse der Gag-Proteine zeigte die Expression des p68^{Gag}-Spaltproduktes in allen Proben außer der Negativkontrolle (Abbildung 4.4 A, Spuren 1-13). Mit dem Env-LP AK konnte in allen Proben das Vorläuferprotein sowie die Leaderpeptid Varianten gp18^{LP} und gp28^{LP} nachgewiesen werden (Abbildung 4.4 A, Spuren 1-13). Die Ansätze zeigten außerdem die charakteristischen Pol-Proteine, dazu zählen das p127^{Pol}-Vorläuferprotein, das Prozessierungsprodukt p85^{PR/RT} und eine schwache Bande des p40^{IN}-Spaltproduktes (Abbildung 4.4 B, Spuren 1-13). In Abbildung 4.4 C, Spuren 1-14 ist die Expression des Proteins GAPDH (36 kDa) dargestellt. Die gleichmäßige Expression dieses zellulären Proteins bestätigte den Einsatz gleicher Volumina (Abbildung 4.4 C, Spuren 1-14).

Wie bereits bei der zellulären Expressionsanalyse der Ansätze mit dem transfizierten wt-4-Komponenten-Vektorsystem festgestellt, wiesen die Zelllysatsproben mit transfizierten p3^{Gag}-Konstrukten im Vergleich zu Proben mit transfiziertem pUC19 ein schwächeres Expressionslevel der Vorläuferproteine und prozessierten Spaltprodukte auf. Dieser inhibierende Effekt der PFV p3^{Gag}-Konstrukte auf die Expression viraler Proteine zeigte sich allerdings erst ab einem transfizierten Verhältnis von 1:3 (Abbildung 4.4, Spuren 5 zu 6 und 7; 8 zu 9 und 10; 11 zu 12 und 13). Zwischen den beiden kotransfizierten p3^{Gag}-Konstrukten p3GFP und p3HA trat keine starke Differenz im Expressionslevel der nachweisbaren Proteine auf (Abbildung 4.4, Spuren 3 zu 4; 6 zu 7; 9 zu 10; 12 zu 13). Das Zelllysate der Referenzprobe p68 zeigte erwartungsgemäß das stärkste Expressionssignal (Abbildung 4.4, Spur 1). Im Allgemeinen war sowohl für die Proben mit kotransfiziertem

pUC19 als auch mit p3^{Gag}-Konstrukten, aufgrund der sich schrittweise halbierten DNA-Menge transfizierter Konstrukte des 4-Komponenten-Vektorsystems, ein abnehmender Gehalt der Expressionsstärke viraler Proteine feststellbar (Abbildung 4.4, Spuren 1-13).

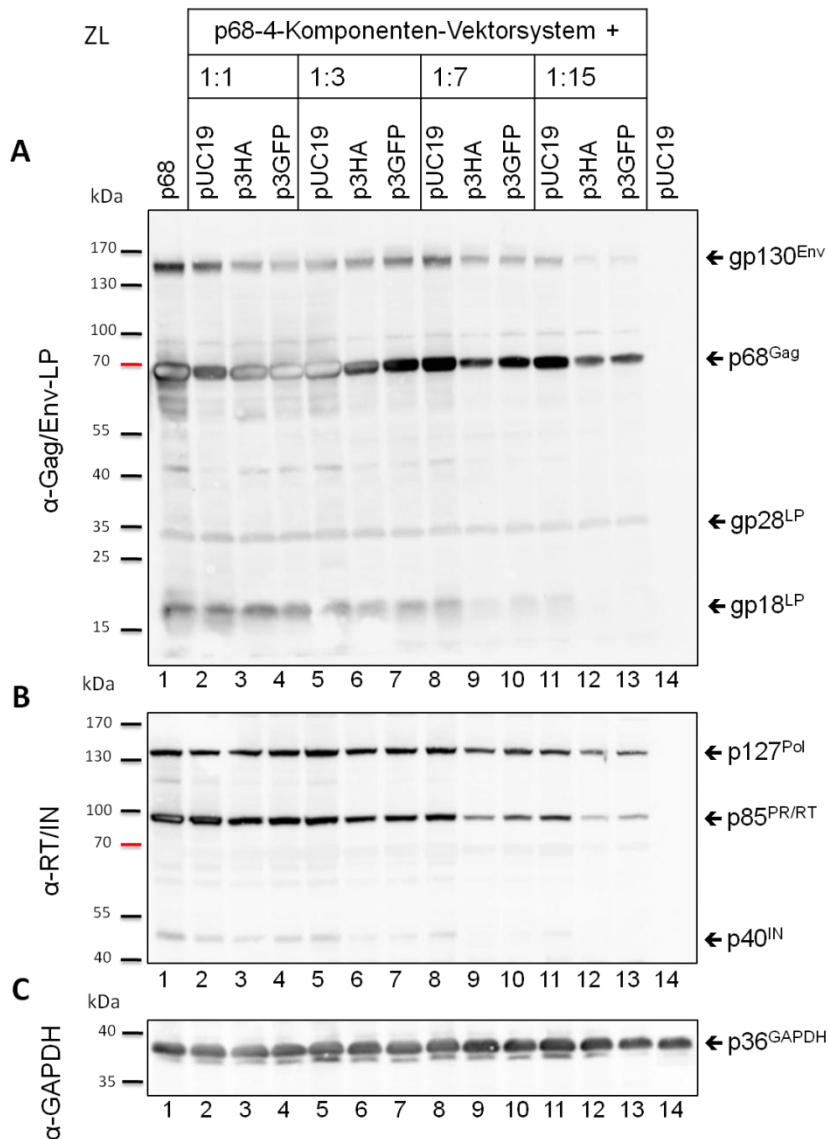


Abbildung 4.4 Biochemische Analyse der zellulären Proteinexpression basierend auf der Kotransfektion des PFV p68-4-Komponenten-Vektorsystems mit dem p3^{Gag}-Fusionskonstrukt in 293T Zellen

Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot der zellulären Expression nach Kotransfektion der PFV Expressionskonstrukte. 293T Zellen wurden einerseits mit dem modifizierten PFV p68-4-Komponenten-Vektorsystem (Spur 1) transfiziert. Das PFV p68-4-Komponenten-Vektorsystem setzt sich aus den expressionsoptimierten Konstrukten pcoPG4 1-621, pcoPP, pcoPE und puc2MD9 zusammen. Andererseits wurde neben dem 4-Komponenten-Vektorsystem das Fusionskonstrukt pcoPGp3 CHA, pcoPGp3 CeGFP oder als Referenz der Leervektor pUC19 kotransfiziert. Dies erfolgte in den Verhältnissen 1:1 (Spuren 2, 3 und 4), 1:3 (Spuren 5, 6 und 7), 1:7 (Spuren 8, 9 und 10) und 1:15 (Spuren 11, 12 und 13). Das Plasmid pUC19 diente als Negativkontrolle (Spur 14). Die aufbereiteten Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, wobei je 40 µl Zelllysate (ZL) auf ein 7,5 %iges Gel aufgetragen wurden. Anschließend erfolgten der Transfer der Proteine (180 mA, 90 min) und die immunologische Detektion der zellulären Proteinexpression. A) Die Detektion der Gag- und Env-Proteine erfolgte mit einem PFV Gag-spezifischen Antikörper (α-PFV Gag936 1:1000) und einem Env-LP-spezifischen Antikörper für PFV (α-PFV Env-LP 1:200). B) Der Nachweis der Pol-Proteine erfolgte mit α-PFV RT (1:400) und α-PFV IN (1:100). C) Der Nachweis der zellulären Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase mit α-GAPDH (1:50000) diente der Ladekontrolle.

Für die Infektionsanalyse der gebildeten viralen Partikel wurde aus zwei unabhängigen Experimenten der Mittelwert gebildet. Die ermittelten relativen Infektionsereignisse sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Die Infektiosität der aus dem p68-4-Komponenten-Vektorsystem gebildeten Viruspartikel der Referenzprobe ohne Kotransfektion von pUC19 oder p3^{Gag}-Konstrukten wurde auf 100 % gesetzt (Abbildung 4.5, p68, schraffierte Säule). Erwartungsgemäß konnte eine abnehmende Infektiosität des p68-4-Komponenten-Vektorsystems bei Viren basierend auf geringerer transfizierter DNA-Mengen verzeichnet werden (Abbildung 4.5, schwarze Säulen). Die Kotransfektion des p3^{Gag}-Konstruktes bewirkte in den Verhältnissen 1:1, 1:3 und 1:7 eine Steigerung der Infektiosität (Abbildung 4.5, 1:1, 1:3 und 1:7). Allgemein wirkte sich die Kotransfektion des p3HA-Konstruktes stärker auf die Infektiosität der freigesetzten Viren aus als die Transfektion des p3GFP-Konstruktes. Im den Verhältnissen 1:1 und 1:3 übertraf der jeweilige infektiöse Titer das Niveau der Referenzprobe p68 um bis zu 30 % (Abbildung 4.5, 1:1-1:3).

Zur Verdeutlichung des Effektes der transfizierten p3^{Gag}-Konstrukte auf die Infektiosität freigesetzter Viruspartikel innerhalb der einzelnen Ansätze, wurde in Tabelle 4.5 der Faktor an Infektionszunahme in den einzelnen DNA-Verhältnissen dargestellt (Tabelle 4.5, 1:1-1:15). Dabei dienten die Proben mit kotransfiziertem pUC19 als Referenzwert. Wie bereits im wt-4-Komponenten-Vektorsystem beschrieben, zeigte das DNA-Verhältnis 1:3 die stärkste Infektionszunahme. Hierbei lag der Faktor bei dem kotransfiziertem p3HA-Plasmid mit ungefähr 4 um das doppelte höher als beim Ansatz mit dem p3GFP-Konstrukt. Einen ähnlichen Effekt zeigte das DNA-Verhältnis 1:1 mit einem 3-fach erhöhten Titer bei kotransfiziertem p3HA-Expressionsplasmid und einer 1,5-fachen Zunahme bei p3GFP. Das transfizierte DNA-Verhältnis 1:15 zeigte hingegen für beide p3^{Gag}-Konstrukte einen negativen Effekt auf die Infektiosität (Abbildung 4.5, 1:15). Der infektiöse Titer sank gegenüber dem Referenzwert mit kotransfiziertem pUC19 um 50 % beim Ansatz mit p3HA und um 20 % beim Ansatz mit p3GFP (Tabelle 4.5, 1:15). Das Verhältnis der Infektionsraten des p68-4-Komponenten-Vektorsystems zum wt-4-Komponenten-Vektorsystem wird in Kapitel 4.2.5 näher betrachtet.

Die Ergebnisse belegen, dass die Anwesenheit des kleinen p3^{Gag}-Spaltproduktes neben dem prozessierten p68^{Gag} einen Effekt auf die Infektiosität der daraus resultierenden viralen Partikel besitzt.

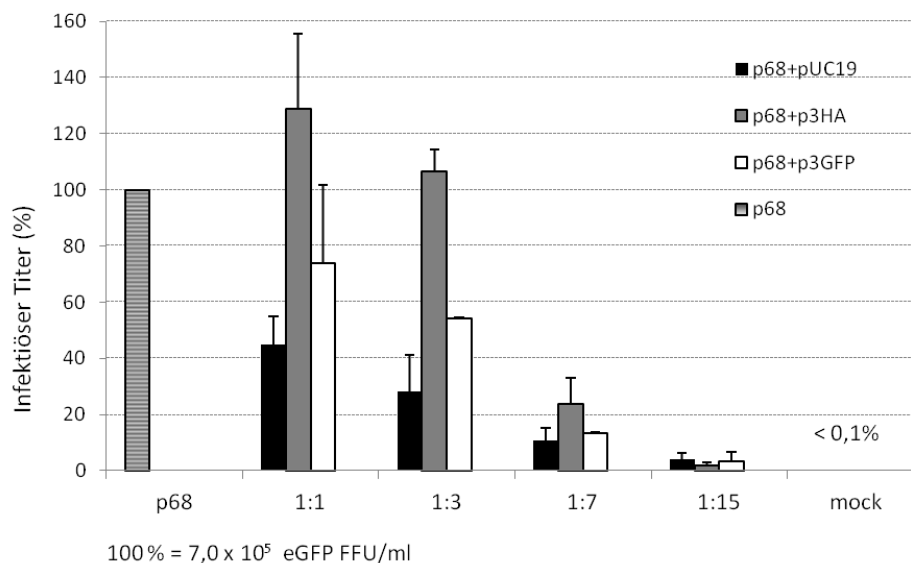


Abbildung 4.5 Relative Infectiosität der aus dem p68-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3^{Gag}-Konstrukten entstandenen Viruspartikel

Infektiöse Partikel entstanden nach Transfektion der 293T Zellen mit dem PFV 4-Komponenten-Vektorsystem. Dargestellt sind die Mittelwerte der infektiösen Virustiter aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden in Bezug auf das modifizierte p68-4-Komponenten-Vektorsystem berechnet, welches 100 % gesetzt wurde. Das modifizierte 4-Komponenten-Vektorsystem setzt sich aus den expressionsoptimierten Konstrukten pcoPG4 1-621, pcoPP, pcoPE und puc2MD9 zusammen. Die p3^{Gag}-Fusionskonstrukte pcoPGp3 CHA und pcoPGp3 CeGFP wurden mit den Konstrukten des 4-Komponenten-Vektorsystems in den Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15 kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente pUC19. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte 72 h nach Infektion der HT1080 Zellen.

Tabelle 4.5 Vergleich der relativen Infectiosität der im kotransfizierten p68-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3^{Gag}-Konstrukten entstandenen Viruspartikel

Die Infectiosität des mit pUC19 kotransfizierten p68-4-Komponenten-Vektorsystems wurde für jedes DNA-Verhältnis auf 100 % gesetzt. Das DNA-Verhältnis gibt das Verhältnis der transfizierten Plasmid-DNA an.

Verhältnis Konstrukte A:B		1:1	1:3	1:7	1:15
Konstrukte					
A) 4-Komponenten-Vektorsystem	B)				
p68	pUC19	1 (100 %)	1 (100 %)	1 (100 %)	1 (100 %)
p68	p3HA	2,9	3,8	2,2	0,5
p68	p3GFP	1,6	1,9	1,2	0,8

4.2.3 Modifiziertes iPR-4-Komponenten-Vektorsystem

Die Transfektion des 4-Komponenten-Vektorsystems mit Protease-inaktivierten Pol-Konstrukten (iPR) in Kombination mit dem Expressionsplasmid für das Vorläuferprotein p71^{Gag} führt nicht zur Bildung infektiöser viraler Partikel, da die Protease-Mutante das PFV Gag-Vorläuferprotein nicht prozessieren kann (Hütter et al., unveröffentlicht). Die Anwesenheit der funktionellen Untereinheit p68^{Gag} scheint für die Bildung infektiöser Virionen

essentiell notwendig. Ob auch die Existenz des zweiten prozessierten Spaltproduktes $p3^{Gag}$ einen Einfluss auf dieses nicht-infektiöse System besitzt, sollte durch Kotransfektion des p3HA-Konstruktes überprüft werden.

Die Vektoren wurden, wie in Tabelle 4.3 beschrieben, transfiziert. Die Analyse der Infektiosität gebildeter Viren ergab keine messbare eGFP-Expression. Da das System nicht zur Bildung infektiöser Viren befähigt war und das $p3^{Gag}$ -Protein keinen Einfluss auf die Infektiosität besaß, wurde auch auf die Darstellung der zellulären Proteinexpression verzichtet. Das Experiment bestätigte, dass die Prozessierung des Vorläuferproteins $p71^{Gag}$ in $p68^{Gag}$ essentiell für die Infektiosität ist.

4.2.4 Modifiziertes $p68^{Gag}$ -iPR-4-Komponenten-Vektorsystem

Die Untersuchung der Wirkung von $p3^{Gag}$ auf die zelluläre Proteinexpression und die Infektionsereignisse erfolgte zudem im PFV $p68$ -iPR-4-Komponenten-Vektorsystem. Die Transfektion der Konstrukte wurde, wie in Kapitel 4.2 und Tabelle 4.3 beschrieben, durchgeführt. Für die Funktionsanalyse des $p3^{Gag}$ wurden in dem folgenden Experiment einerseits das p3HA-Konstrukt und andererseits das p3GFP-Konstrukt eingesetzt.

Die biochemische Analyse der zellulären Proteinexpression ist anhand eines repräsentativen Western Blots in Abbildung 4.6 dargestellt. Erwartungsgemäß führten alle Proben zur Expression des verkürzten 68 kDa großen Gag-Proteins (Abbildung 4.6 A, Spuren 1-13). Außerdem konnte mit dem Env-LP AK in allen Proben das Env-Vorläuferprotein sowie die Leaderpeptid Varianten $gp18^{LP}$ und $gp28^{LP}$ nachgewiesen werden (Abbildung 4.6 A, Spuren 1-13). Im Vergleich zu den Zelllysatsproben des transfizierten wt- oder $p68$ -4-Komponenten-Vektorsystems (Abbildung 4.2 und 4.4) war für die Proben des transfizierten $p68$ -iPR-4-Komponenten-Vektorsystems ausschließlich die Detektion des $p127^{Pol}$ -Vorläuferproteins und nicht der Prozessierungsprodukte $p85^{PR/RT}$ und $p40^{IN}$ möglich, da in dieser Mutante die Protease inaktiviert wurde (Abbildung 4.6 B, Spuren 1-13). Der Nachweis der GAPDH-Expression diente wiederum als Ladekontrolle und bestätigte das Auftragen gleicher Volumina für die einzelnen Proben (Abbildung 4.6 C, Spuren 1-14).

Wie bereits für die Ansätze der wt- und $p68$ -4-Komponenten-Vektorsysteme festgestellt, führte die Kotransfektion von p3HA oder p3GFP mit dem 4-Komponenten-Vektorsystem zur abgeschwächten Expression der viralen Proteine. Je höher die Menge der transfizierten $p3^{Gag}$ -Konstrukte war, desto deutlicher trat der inhibierende Effekt auf. Zwischen den beiden kotransfizierten $p3^{Gag}$ -Konstrukten p3GFP und p3HA war keine starke Differenz im Expressionslevel erkennbar (Abbildung 4.6, Spuren 3 zu 4; 6 zu 7; 9 zu 10; 12 zu 13).

Im Allgemeinen war sowohl für die Proben mit kotransfiziertem pUC19 als auch mit p3^{Gag}-Konstrukten aufgrund der sich schrittweise halbierten DNA-Menge transfizierter Konstrukte des 4-Komponenten-Vektorsystems ein abnehmender Gehalt der Expressionsstärke viraler Proteine feststellbar (Abbildung 4.6, Spuren 1-13).

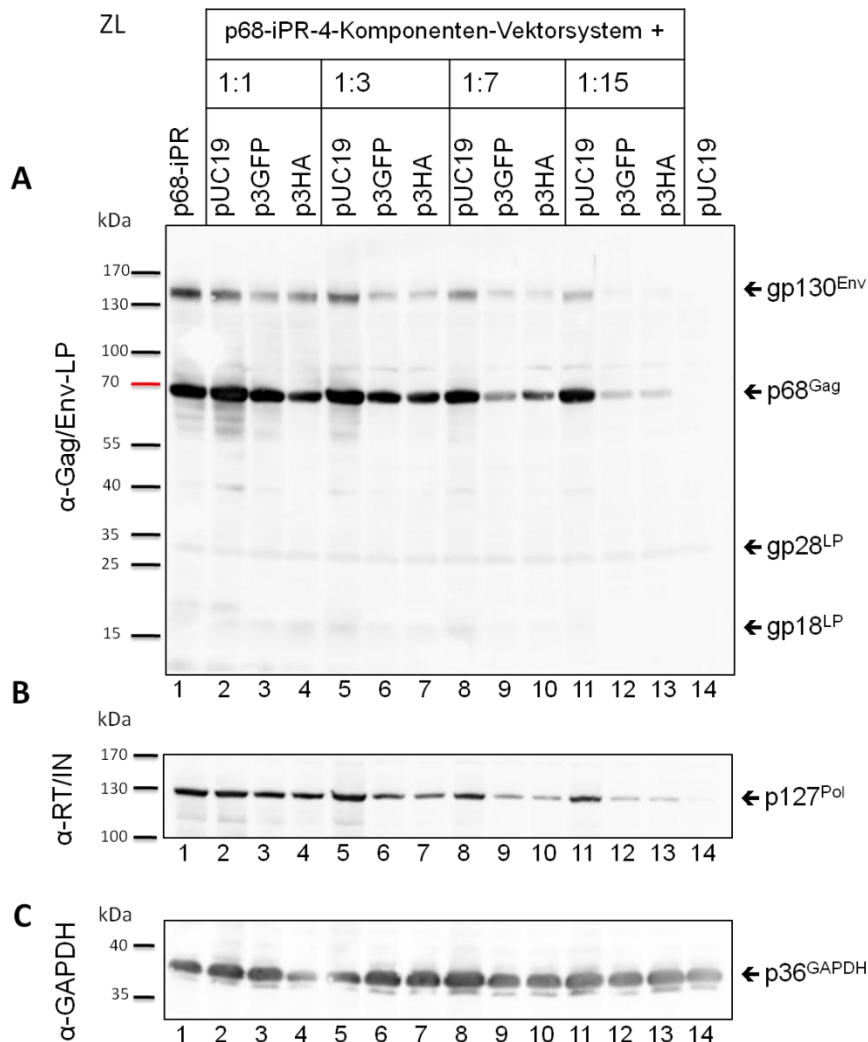


Abbildung 4.6 Biochemische Analyse der zellulären Proteinexpression basierend auf der Kotransfektion des PFV p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystems mit dem p3^{Gag}-Fusionskonstrukt in 293T Zellen

Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot der zellulären Expression nach Kotransfektion der PFV Expressionskonstrukte. 293T Zellen wurden einerseits mit dem modifizierten PFV p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystem (Spur 1) transfiziert. Das PFV 4-Komponenten-Vektorsystem setzt sich aus den expressionsoptimierten Konstrukten pcoPG4 1-621, pcoPP1 (iPR), pcoPE und puc2MD9 zusammen. Andererseits wurde neben dem 4-Komponenten-Vektorsystem das Fusionskonstrukt pcoPGp3 CHA, pcoPGp3 CeGFP oder als Referenz der Leervektor pUC19 kotransfiziert. Dies erfolgte in den Verhältnissen 1:1 (Spuren 2, 3 und 4), 1:3 (Spuren 5, 6 und 7), 1:7 (Spuren 8, 9 und 10) und 1:15 (Spuren 11, 12 und 13). Das Plasmid pUC19 diente als Negativkontrolle (Spur 14). Die aufbereiteten Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, wobei je 40 μ l Zelllysate (ZL) auf ein 7,5 %iges Gel aufgetragen wurden. Anschließend erfolgten der Transfer der Proteine (180 mA, 90 min) und die immunologische Detektion der zellulären Proteinexpression. A) Die Detektion der Gag- und Env-Proteine erfolgte mit einem PFV Gag-spezifischen Antikörper (α -PFV Gag936 1:1000) und einem Env-LP-spezifischen Antikörper für PFV (α -PFV Env-LP 1:200). B) Der Nachweis der Pol-Proteine erfolgte mit α -PFV RT (1:400) und α -PFV IN (1:100). C) Der Nachweis der zellulären Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase mit α -GAPDH (1:50000) diente der Ladekontrolle.

Für die Infektionsanalyse der gebildeten viralen Partikel wurde aus zwei unabhängigen Experimenten der Mittelwert gebildet. Die ermittelten relativen Infektionsereignisse sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Die Infektiosität der auf dem p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystem basierenden Viruspartikel der Referenzprobe ohne Kotransfektion von pUC19 oder p3^{Gag}-Konstrukten wurde auf 100 % gesetzt (Abbildung 4.7, p68-iPR, schraffierte Säule).

Erwartungsgemäß konnte wiederum eine abnehmende Infektiosität des p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystems bei Viren basierend auf geringerer transfizierter DNA-Mengen verzeichnet werden (Abbildung 4.7, schwarze Säulen). Die Kotransfektion des p3^{Gag}-Konstruktes bewirkte in den Verhältnissen 1:1, 1:3 und 1:7 eine Steigerung der Infektiosität (Abbildung 4.7, 1:1-1:7). Wie bereits im p68-4-Komponenten-Vektorsystem beschrieben, resultierte aus der Kotransfektion des p3HA-Konstruktes in den DNA-Verhältnissen 1:1 und 1:3 eine stärkere Infektionszunahme der freigesetzten Viren als aus der Transfektion des p3GFP-Konstruktes (Abbildung 4.7, 1:1-1:3). Im Gegensatz zum wt- und p68-4-Komponenten-Vektorsystem erreichte kein Ansatz den infektiösen Titer der Referenzprobe p68-iPR (Abbildung 4.7).

Zur Verdeutlichung des Effektes der transfizierten p3^{Gag}-Konstrukte auf die Infektiosität freigesetzter Viruspartikel innerhalb der einzelnen Ansätze wurde in Tabelle 4.7 der Faktor an Infektionszunahme in den einzelnen DNA-Verhältnissen dargestellt (Tabelle 4.7, 1:1-1:15). Dabei dienten die Proben mit kotransfiziertem pUC19 als Referenzwert. Wie bereits im wt-4-Komponenten-Vektorsystem beschrieben, erreichte das DNA-Verhältnis 1:3 bei kotransfiziertem p3HA die stärkste Infektionszunahme. Hierbei lag der Faktor mit ungefähr 2 um das doppelte höher als beim Ansatz mit p3GFP. Das transfizierte DNA-Verhältnis 1:15 zeigte für beide p3^{Gag}-Konstrukte einen negativen Effekt auf die Infektiosität (Abbildung 4.7, 1:15). Hierbei sank der infektiöse Titer um 60 % gegenüber des Referenzwertes mit kotransfiziertem pUC19 (Tabelle 4.6, 1:15). Das Verhältnis der Infektionsraten der verschiedenen 4-Komponenten-Vektorsysteme zueinander wird in Kapitel 4.2.5 näher betrachtet.

Die Ergebnisse belegen, dass die Anwesenheit des kleinen p3^{Gag}-Spaltproduktes neben dem prozessierten p68^{Gag} einen leicht positiven Effekt auf die Infektiosität der daraus resultierenden viralen Partikel besitzt.

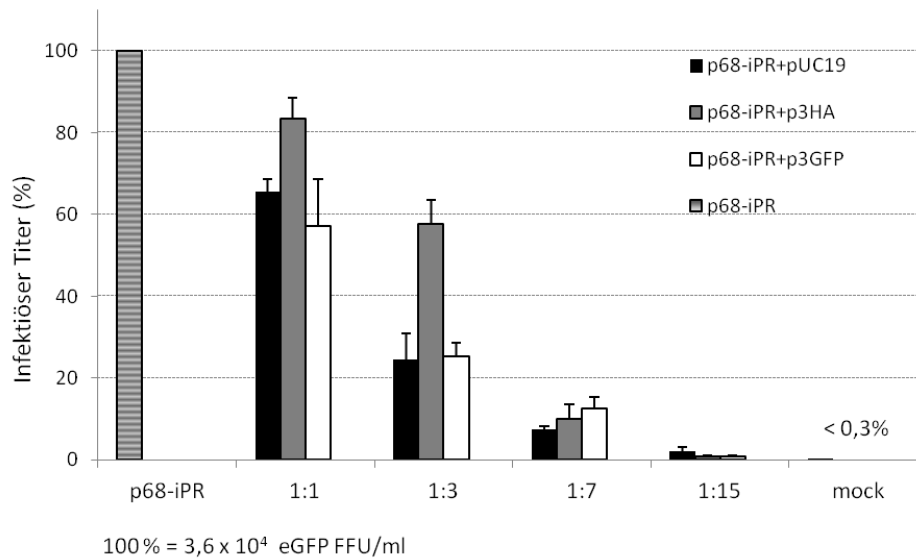


Abbildung 4.7 Relative Infektiosität der aus dem p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3^{Gag}-Konstrukten entstandenen Viruspartikel

Infektiöse Partikel entstanden nach Transfektion der 293T Zellen mit dem PFV 4-Komponenten-Vektorsystem. Dargestellt sind die Mittelwerte der infektiösen Virustiter aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden in Bezug auf das modifizierte p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystem berechnet, welches 100 % gesetzt wurde. Das modifizierte 4-Komponenten-Vektorsystem setzt sich aus den expressionsoptimierten Konstrukten pcoPG4 1-621, pcoPP1 (iPR), pcoPE und puc2MD9 zusammen. Die p3^{Gag}-Fusionskonstrukte pcoPGp3 CHA und pcoPGp3 CeGFP wurden mit den Konstrukten des 4-Komponenten-Vektorsystems in den Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15 kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente pUC19. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte 72 h nach Infektion der HT1080 Zellen.

Tabelle 4.6 Vergleich der relativen Infektiosität der im kotransfizierten p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3^{Gag}-Konstrukten entstandenen Viruspartikel

Die Infektiosität des mit pUC19 kotransfizierten p68-iPR4-Komponenten-Vektorsystems wurde für jedes DNA-Verhältnis auf 100 % gesetzt. Das DNA-Verhältnis gibt das Verhältnis der transfizierten Plasmid-DNA an.

Verhältnis Konstrukte A:B		1:1	1:3	1:7	1:15
Konstrukte					
A) 4-Komponenten-Vektorsystem	B)				
p68-iPR	pUC19	1 (100 %)	1 (100 %)	1 (100 %)	1(100 %)
p68-iPR	p3HA	1,3	2,3	1,3	0,4
p68-iPR	p3GFP	0,9	1,0	1,6	0,4

4.2.5 Übersicht zur Infektionsanalyse der generierten viralen Partikel basierend auf Koexpression des p3HA-Fusionskonstruktes im 4-Komponenten-Vektorsystem

Um den Einfluss des p3^{Gag}-Proteins auf die Infektiosität gebildeter Viren zusammenfassen zu können, wurde eine vergleichende Analyse in den 4-Komponenten-Vektorsystemen wt, p68 und p68-iPR in einem Experiment durchgeführt. Die Transfektion der Konstrukte erfolgte wie in Kapitel 4.2 und Tabelle 4.3 beschrieben, allerdings nur in den DNA-Verhältnissen 1:1 und 1:3. Die Auswahl beschränkte sich auf diese beiden Verhältnisse, weil für Proben mit diesen transfizierten DNA-Verhältnissen die höchsten Infektionsraten gegenüber den Referenzproben erreicht wurden (Kapitel 4.2.1-4.2.4). Für die Untersuchung der Wirkung von PFV p3^{Gag} auf die Infektionsereignisse wurde das folgende Experiment mit dem p3HA-Konstrukt durchgeführt, weil das Konstrukt verglichen mit dem p3GFP-Expressionsplasmid einen größeren Einfluss auf die Infektiosität aufwies. Auf eine erneute Darstellung der zellulären Proteinexpression wurde verzichtet, da die Zellysate der Proben ein identisches Expressionsmuster wie die bereits durchgeführten biochemischen Analysen aufzeigten (Abbildung 4.2, 4.4 und 4.6). Die Kotransfektion von p3^{Gag}-Konstrukten bedingte eine geringere Expressionsstärke viraler Proteine.

Der Versuch wurde bislang einmalig durchgeführt, sodass für eine gesicherte Aussage mindestens eine Wiederholung angesetzt werden sollte.

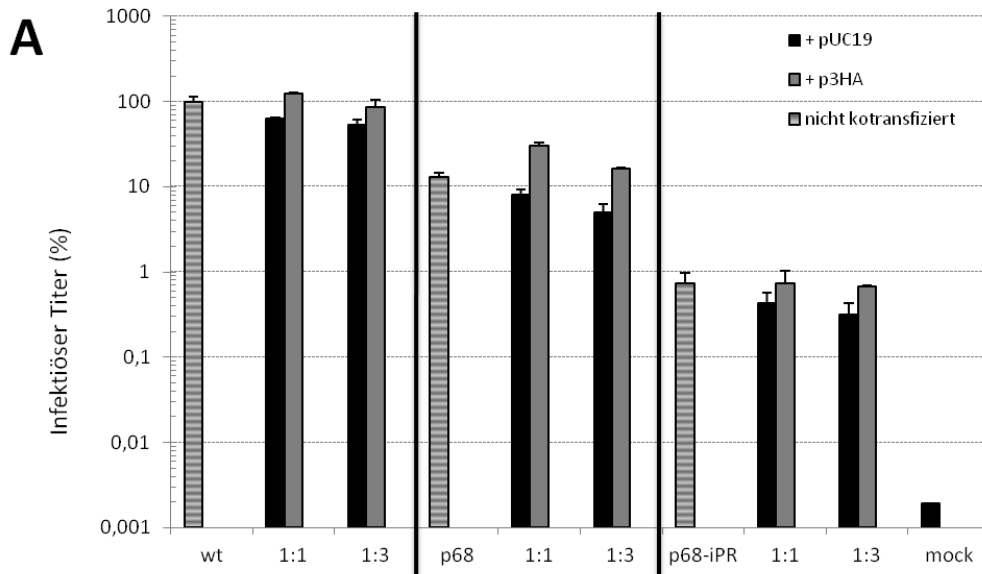
Die ermittelten Daten der Infektionsanalyse der freigesetzten Partikel sind in Abbildung 4.8 hinterlegt. Abbildung 4.8 A soll die getesteten 4-Komponenten-Vektorsysteme vergleichend darstellen. Teil A weist im Gegensatz zu den vorherigen Darstellungen eine logarithmische Skalierung der y-Achse auf. Die nicht logarithmische Skalierung würde eine erkennbare Darstellung der Infektionsdaten der freigesetzten Partikel des p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystems verhindern, da nur geringe Titer erreicht wurden (Abbildung 4.8 A, p68-iPR, schraffierte Säule). In der Abbildung wurden alle Werte in Bezug zum wt gebracht, der die Referenzprobe bildete. Die Infektiosität der aus dem wt-4-Komponenten-Vektorsystem hervorgegangenen Viruspartikel ohne Kotransfektion von pUC19 oder p3HA-Konstrukten wurde auf 100 % gesetzt (Abbildung 4.8 A, wt, schraffierte Säule). Abbildung 4.8 B stellt ebenfalls die relativen Infektionsereignisse dar, wobei die Referenzwerte der unterschiedlichen 4-Komponenten-Vektorsysteme jeweils 100 % gesetzt wurden (Abbildung 4.8 B wt, p68, p68-iPR, schraffierte Säulen).

Wie bereits festgestellt, bewirkte die Kotransfektion des p3HA-Konstruktes für alle untersuchten 4-Komponenten-Vektor-Systeme eine Steigerung der Infektiosität (Abbildung 4.8). Die aus dem p68-4-Komponenten-Vektorsystem ohne Kotransfektion von p3HA oder pUC19 hervorgegangenen Viren wiesen, in Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Hütter et al., einen 10-fach verringerten infektiösen Titer auf (Hütter et al., unveröffentlicht). Der Ansatz des p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystems zeigte eine um den Faktor

100 reduzierte Infektiosität (Abbildung 4.8 A, p68-iPR). Durch die Kotransfektion von p3HA konnte die um den Faktor 10 zum wt verringerte Infektiosität der aus dem p68-4-Komponenten Systems gebildeten Viren auf den Faktor 2 reduziert werden (Abbildung 4.8 A, wt 1:1 zu p68 1:1). Der Ansatz des wt-4-Komponenten-Vektorsystems, kotransfiziert mit pUC19 im Verhältnis 1:1, erreichte hierbei einen relativen Titer von rund 60 % (Abbildung 4.8 A, wt 1:1). Im Vergleich dazu konnte mit dem Ansatz des p68-4-Komponenten-Vektorsystems, kotransfiziert mit dem p3HA-Expressionsplasmid im gleichen Verhältnis, ein infektiöser Titer von 30 % erreicht werden (Abbildung 4.8 A, p68 1:1). Die Infektiosität der auf dem p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystem beruhenden Viruspartikel erhöht sich zwar ebenfalls durch Kotransfektion des p3HA-Konstruktes, allerdings nicht annähernd auf wt-Niveau. Die Infektionszunahme erreicht maximal das Niveau der Referenzprobe p68-iPR und somit einen rund 100-fach reduzierten Titer gegenüber der wt-Probe (Abbildung 4.8 A). Im Allgemeinen konnte der reduzierte infektiöse Titer durch den Einsatz verringelter Mengen des transfizierten 4-Komponenten-Vektorsystems begründet in jedem Fall durch Kotransfektion des p3HA-Konstruktes aufgehoben und die Ausgangsinfektiosität wiederhergestellt oder übertroffen werden.

Zur Verdeutlichung des Effektes der p3HA-Konstrukte auf die Infektiosität freigesetzter Viruspartikel innerhalb der einzelnen Ansätze wurde in Tabelle 4.8 der Faktor an Infektionszunahme in den einzelnen DNA-Verhältnissen dargestellt. Dabei dienten die Proben mit kotransfiziertem pUC19 als Referenzwert.

Die bereits in den einzeln untersuchten 4-Komponenten-Vektorsystemen ermittelten Infektionszunahmen der Ansätze konnten in diesem Experiment bestätigt werden. Einzig die Proben der transfizierten Verhältnisse 1:1 wiesen eine leicht stärkere Zunahme der Infektionsereignisse auf. Die höchste resultierende Infektionszunahme konnte für die Ansätze des p68-4-Komponenten-Vektorsystems beobachtet werden. Durch Kotransfektion von p3HA-Konstrukten stieg die Infektiosität auf das 4-fache an (Abbildung 4.8 B p68 1:1). Im Vergleich zu den Ansätzen des wt- oder p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystems lag die Infektionszunahme um das doppelte höher (Abbildung 4.8 B).



A) 100 % = $3,7 \times 10^6$ eGFP FFU/ml

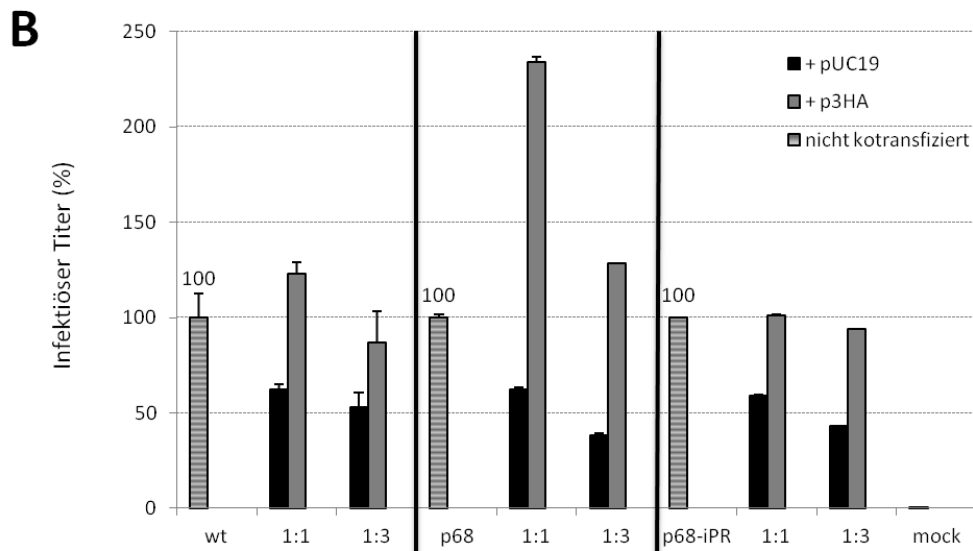


Abbildung 4.8 Relative Infektiosität der aus dem 4-Komponenten-Vektorsystem mit p3HA-Konstrukten entstandenen Viruspartikel

Infektiöse Partikel entstanden nach Transfektion der 293T Zellen mit dem PFV 4-Komponenten-Vektorsystem. Dargestellt sind die relativen Infektionsereignisse aus einem Experiment. Das p3HA-Fusionskonstrukt wurde mit den Konstrukten der 4-Komponenten-Vektorsysteme in den Verhältnissen 1:1 und 1:3 kotransfiziert. Die infektiösen Titer wurden für das wt-4-Komponenten-Vektorsystem, das p68-4-Komponenten-Vektorsystem und das p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystem ermittelt. Als Negativkontrolle diente pUC19. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte 72 h nach Infektion der HT1080 Zellen. A) Die Werte wurden in Bezug auf das wt-4-Komponenten-Vektorsystem berechnet, welches 100 % gesetzt wurde. B) Die Werte wurden in Bezug zum jeweiligen 4-Komponenten-Vektorsystem (wt, p68, p68-iPR) berechnet, welches je 100 % gesetzt wurden.

Tabelle 4.7 Vergleich der relativen Infektiosität der in 4-Komponenten-Vektorsystemen mit p3^{Gag}-Konstrukten entstandenen Viruspartikel

Die Infektiosität der mit pUC19 kotransfizierten 4-Komponenten-Vektorsysteme wurden für jedes DNA-Verhältnis auf 100 % gesetzt. Das DNA-Verhältnis gibt das Verhältnis der transfizierten Plasmid-DNA an.

Verhältnis der Konstrukte A:B		1:1	1:3
Konstrukte			
A) 4-Komponenten-Vektorsystem	B)		
4-Komponenten-Vektorsystem	pUC19	1 (100 %)	1 (100 %)
wt	p3HA	2,0	1,6
p68	p3HA	3,8	3,4
p68-iPR	p3HA	1,7	2,2

4.3 Biochemische Analyse der zellulären Expression bzw. Partikelassoziation der p3^{Gag}HA- und p3^{Gag}eGFP- Fusionsproteine

Zum Nachweis der C-terminal getaggten p3^{Gag}-FP p3^{Gag}HA und p3^{Gag}eGFP wurde ein immunologischer Nachweis mit spezifischen Antikörpern für HA oder eGFP durchgeführt. Die Fusionen des HA (1 kDa)- bzw. eGFP (27 kDa)- Konstruktes, sowie des Glycin-Serin-Linkers (1 kDa) bewirken eine Mobilitätsänderung der p3^{Gag}-Proteine im Polyacrylamidgel. Das p3^{Gag}HA-FP lässt sich nach Inkubation mit einem gegen das HA-Protein gerichteten AK bei einer Molekulargewichtsmarkierung von 5 kDa nachweisen. Für das p3^{Gag}eGFP-FP resultiert eine Proteingröße von 31 kDa, die mit einem gegen das eGFP-Protein gerichteten AK detektiert werden kann.

Für die Untersuchung der zellulären Proteinexpression des p3^{Gag}HA wurde repräsentativ das expressionsoptimierte wt-4-Komponenten-Vektorsystem mit p3HA in den Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15 in 293T Zellen kotransfiziert. Das DNA-Verhältnis kann den Tabellen 4.2 und 4.3 entnommen werden. Als Referenz wurde ein C-terminal fusioniertes PFV Gag-Volllänge-konstrukt mit HA (p71HA) eingesetzt. Die Negativkontrolle bildete das transfizierte Plasmid pUC19. Die Zelllysate wurden wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben aufbereitet, die Proteine auf einem 15 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Allerdings war der Nachweis des p3^{Gag}HA-Proteins nicht möglich. Ausschließlich die Probe mit dem transfizierten p71HA-Konstrukt lieferte mit einem HA-spezifischen AK ein messbares Expressionssignal (73 kDa). Da scheinbar die Schwierigkeit im Nachweis der kleinen Proteingröße von 5 kDa lag, wurden anschließend verschiedene Western Blot Bedingungen geprüft. Einstellbare Variablen waren dabei der Transferpuffer, die Transferzeiten (60-90 min) und die Stromstärke des Transfers (0,8-1,0 mA/cm²). Des Weiteren wurden auch Gradientengele (4-12 %) eingesetzt. Trotz Optimie-

rung der Western Blot Bedingungen für den Nachweis kleiner Proteine, konnte das $p3^{Gag}$ HA-Protein nicht nachgewiesen werden. Auf eine Darstellung des Western Blots wurde deshalb verzichtet.

Zur immunologischen Analyse der $p3^{Gag}$ eGFP-Expression erfolgte einerseits die Untersuchung der zellulären Expression. Andererseits wurde auch die Partikelassoziation des $p3^{Gag}$ eGFP-Proteins analysiert. Um die zelluläre Proteinexpression zu untersuchen, wurden Zelllysate der transfizierten 293T Zellen hergestellt und die Proteinproben aufbereitet. Zur Analyse der Partikelfreisetzung wurden die extrazellulären Viruspartikel aus dem Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen durch Ultrazentrifugation (Partikelpräparation) isoliert. Die Proben aus der Partikelpräparation (PP) und der Zelllyse (ZL) wurden in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot analysiert (Abbildung 4.9).

Für die Untersuchung wurde das expressionsoptimierte wt-4-Komponenten-Vektorsystem mit dem $p3^{GFP}$ -Konstrukt in dem DNA-Verhältnissen 1:3 und 1:7 in 293T Zellen kotransfiziert (Abbildung 4.9, Spuren 2 und 3). Die DNA-Verhältnisse können den Tabellen 4.2 und 4.3 entnommen werden. Zur Kontrolle der eGFP-Detektion wurde in Probe 1 ein C-terminal fusioniertes $p71^{Gag}$ eGFP-Konstrukt kotransfiziert (Abbildung 4.9, Spur1). Anstelle des Transfervektors $puc2MD9$ enthielt das eingesetzte 4-Komponenten-Vektorsystem den Vektor $puc2MD9red$. Im Gegensatz zu $puc2MD9$ der eine *egfp*-Kassette beinhaltet, verfügt der Transfektor $puc2MD9red$ über eine *dsRedEx2*-Kassette. Eine zusätzliche eGFP-Expression durch den Transfektor wird damit vermieden. Weitere Ansätze sollten als Kontrolle der eGFP-Expression dienen. Die Ansätze enthielten ausschließlich das transfizierte eGFP-Plasmid oder das $p3^{GFP}$ -Konstrukt (Abbildung 4.9, Spuren 4 und 5).

Mit dem eingesetzten eGFP AK (ZL 1:5000, PP 1:1000) können alle exprimierten eGFP-Proteine und eGFP-FP detektiert werden. Der Western Blot zeigte in Spur 1 für Viruspartikel und Zelllysat das $p71^{Gag}$ eGFP-Vorläuferprotein und die prozessierte Form $p3^{Gag}$ eGFP (Abbildung 4.9 A und B, Spur 1). In den Spuren 2 und 3 wurden zellulär und partikulär $p3^{Gag}$ eGFP-Proteine nachgewiesen (Abbildung 4.9 A und B, Spuren 2 und 3). Erwartungsgemäß konnte die zelluläre Proteinexpression von eGFP (27kDa) und $p3^{Gag}$ eGFP (31kDa) in den Spuren 4 und 5 detektiert werden (Abbildung 4.9 A Spuren 4 und 5). In den partikulären Proben 4 und 5 konnten jedoch ebenfalls die Proteine eGFP bzw. $p3^{Gag}$ eGFP nachgewiesen werden, obwohl die Bildung und Freisetzung viraler Partikel ausgeschlossen ist (Abbildung 4.9 B Spuren 4 und 5). Das Protein eGFP scheint auch unspezifisch freigesetzt und sogar durch Ultrazentrifugation pelletiert zu werden. Daher ist zunächst keine Aussage möglich, ob $p3^{Gag}$ eGFP Partikel-assoziiert vorliegt oder nicht.

Zur Kontrolle des transfizierten 4-Komponenten-Vektorsystems und der Expression viraler Proteine wurden zusätzlich die Gag- und Env-Proteine zellulär und partikulär detektiert. Im ZL und der PP konnten in den Spuren 1, 2 und 3 das p71^{Gag}-Vorläuferprotein (Spur 1: p71^{Gag}eGFP) und die prozessierte Untereinheit p68^{Gag} nachgewiesen werden (Abbildung 4.9 C und D, Spuren 1-3). Im Zelllysate der zellulären Proteine waren für die ersten drei Proben das gp130^{Env}-Vorläuferprotein und die Untereinheit gp18^{LP} detektierbar (Abbildung 4.9 C, Spuren 1-3). Das Env-Vorläuferprotein liegt in Viruspartikeln prozessiert in seine Untereinheiten vor. Der Env-LP AK konnte in den Proben der PP diese prozessierten Leaderpeptid Varianten gp38^{LP}, gp28^{LP} und gp18^{LP} nachweisen (Abbildung 4.9 D, Spuren 1-3). Für die Proben 1 bis 3 konnte sowohl eine schwächere Expressionsstärke der Gag und Env-Proteine als auch eine schwächere Partikelfreisetzung festgestellt werden (Abbildung 4.9 C und D, Spuren 1-3).

Probe 1 zeigt insgesamt die stärkste Viruspartikelfreisetzung, wohingegen die Proben 2 und 3 eine verringerte Partikelfreisetzung aufwiesen, was mit der verringerten Menge an transfizierten Konstrukten des 4-Komponenten-Vektorsystems korreliert (Abbildung 4.9 C und D, Spuren 1-3).

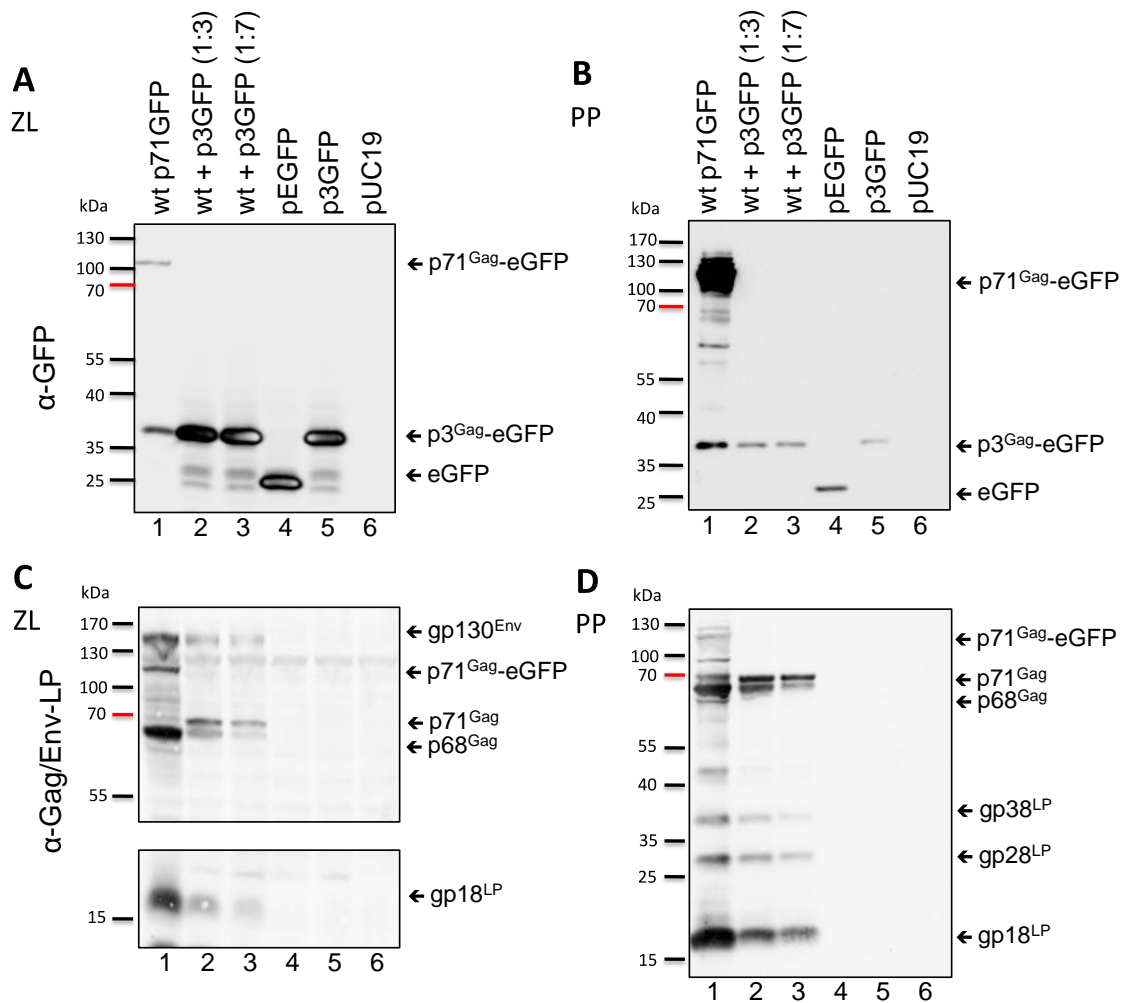


Abbildung 4.9 Biochemische Analyse der zellulären p3^{Gag}eGFP-Proteinexpression und Partikelassoziation

293T Zellen wurden zunächst mit dem p71^{Gag}eGFP markiertem PFV 4-Komponenten-Vektorsystem (Spur 1) transfiziert. Weiterhin wurde neben dem 4-Komponenten-Vektorsystem das Fusionskonstrukt p3GFP in den Verhältnissen 1:3 und 1:7 kotransfiziert (Spuren 2 und 3). Das 4-Komponenten-Vektorsystem setzt sich aus dem Konstrukt für das Kapsid (p71^{Gag}/p71^{Gag}eGFP) und den Konstrukten pcoPP, pcoPE und puc2MD9red zusammen. In den Spuren 4 und 5 wurde nur pEGFP bzw. p3GFP transfiziert. Das Plasmid pUC19 diente als Negativkontrolle (Spur 6). Die aufbereiteten Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, wobei je 40 µl Zelllysate (ZL) oder 70 µl Ansatz einer Partikelpräparation (PP) auf ein 10 %iges Gel aufgetragen wurden. Anschließend erfolgten der Transfer der Proteine (150 mA, 60 min) und die immunologische Detektion der zellulären Proteinexpression und der Partikel-assoziierten Proteine. A) Für die Detektion der eGFP-Proteine und eGFP-Fusionsproteine p3^{Gag}eGFP wurde der AK mit α-GFP (ZL 1:5000, PP 1:1000) eingesetzt. B) Der Nachweis der Gag- und Env-Proteine erfolgte mit α-PFV Gag936 (1:1000) und α-PFV Env-LP (1:200).

Das Phänomen der unspezifischen eGFP-Freisetzung bei alleiniger Transfektion eines eGFP-Plasmids oder des p3GFP-Konstruktes führte zu der Frage, ob es sich bei dem in den viralen Partikelpräparationen detektierten p3^{Gag}eGFP wirklich um ein Partikel-assoziiertes Protein handelt oder ob die Signale ebenfalls durch die unspezifische Freisetzung entstanden (Abbildung 4.9 B Spuren 2 und 3). Zur Klärung dieser Frage wurde ein Subtilisinverdau durchgeführt. Die durch Transfektion gewonnenen viralen Partikel werden mit der nicht-membranpermeablen Serinprotease Subtilisin behandelt und an-

schließlich im Western Blot auf ihre Proteinzusammensetzung hin analysiert. Proteine die im Inneren des Viruspartikels liegen sind für die Protease nicht zugänglich, da diese durch die virale Hüllmembran vor dem Verdau geschützt sind. Durch die Subtilisinbehandlung werden sowohl Proteine die sich an der Oberfläche der viralen Partikel befinden als auch nicht-Partikel-assoziierte Proteine verdaut.

Zur Analyse wurde einerseits das p3GFP-Konstrukt mit dem 4-Komponenten-Vektorsystem kotransfiziert (Abbildung 4.10, Spur 1). Andererseits wurde das p3GFP- bzw. das eGFP-Plasmid einzeln transfiziert, um zu prüfen, ob das freigesetzte eGFP vollständig verdaut wird, da diese nicht-Partikel-assoziiert vorliegen sollten (Abbildung 4.10, Spuren 2 und 3). Die Herstellung sowie Analyse der Proteinproben erfolgte wie bereits beschrieben. Eine Hälfte der erhaltenen viralen Partikel wurde, nach Ultrazentrifugation der Zellkulturüberstände, mit Subtilisin verdaut (Sub+) und der andere Teil unbehandelt (Sub-) aufgetragen (Abbildung 4.10).

Das Ergebnis der einzeln transfizierten Proben (eGFP- oder p3G^{eGFP}-Konstrukt) zeigte, dass nach dem Subtilisinverdau der Partikel die Signale eGFP und p3^{Gag}eGFP weiterhin sichtbar waren (Abbildung 4.10 A, Spuren 2 und 3). Das Ergebnis lässt vermuten, dass die unspezifisch freigesetzten eGFP- oder auch p3^{Gag}eGFP-Proteine ebenfalls durch eine Membran umhüllt sind. Damit wären sie resistent gegenüber dem proteolytischen Verdau und es kann keine eindeutige Antwort auf die Frage gefunden werden, ob die p3^{Gag}eGFP-Proteine Partikel-assoziiert sind oder nicht.

Zur Kontrolle des vollständigen Verdaus aller nicht-membranumhüllten Proteindomänen erfolgte die Detektion der Env-LP Untereinheiten. Der Verdau der extrazellulären Domänen bewirkte, dass anstelle von gp18^{LP} das Leaderpeptid gp11^{LP} detektiert wurde (Abbildung 4.10 B, Spuren 1+ und 1-). Eine weitere Kontrolle wäre der immunologische Nachweis der SU-Untereinheit. Das extrazelluläre, nicht durch eine Lipidmembran geschützte Protein, erfährt einen vollständigen Abbau durch die Protease. Die Gag-Expression in den Proben des 4-Komponenten-Vektorsystems blieb durch den Subtilisinverdau unverändert (Abbildung 4.10 B, Spuren 1+ und 1-).

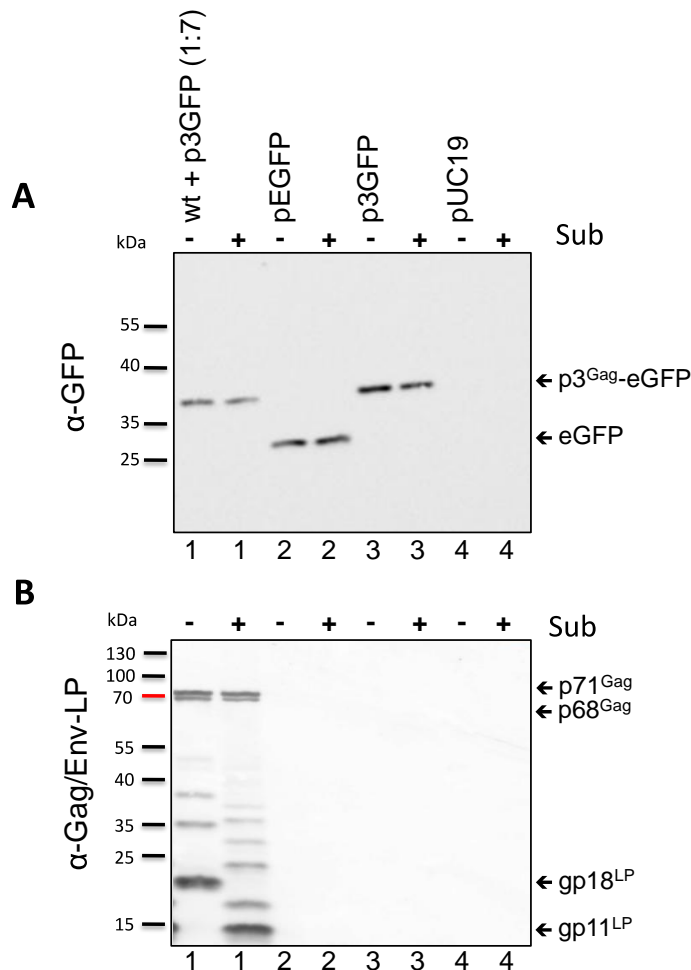


Abbildung 4.10 Biochemische Analyse der Partikelassoziation von p3^{Gag}eGFP-Proteinen nach Subtilisinverdau

293T Zellen wurden mit dem PFV 4-Komponenten-Vektorsystem und dem p3GFP-Konstrukt in dem DNA-Verhältnis 1:7 kotransfiziert (Spur 1). Das hier transfizierte PFV 4-Komponenten-Vektorsystem setzt sich aus den expressionsoptimierten Konstrukten pcoPG4, pcoPP, pcoPE und puc2MD9red zusammen. In den Spuren 2 und 3 wurden pEGFP bzw. pcoPGp3 CeGFP einzeln transfiziert. Das Plasmid pUC19 diente als Negativkontrolle (Spur 4). Die viralen Partikel (Partikelpräparation) wurden mit (+) bzw. ohne (-) Subtilisin (Sub) behandelt. Die aufbereiteten Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, wobei je 60 µl Probe auf ein 10 %iges Gel aufgetragen wurden. Anschließend erfolgten der Transfer der Proteine (150 mA, 60 min) und die immunologische Detektion. A) Für die Detektion der eGFP-Proteine und eGFP-Fusionsproteine p3^{Gag}eGFP wurde der AK α-GFP (1:1000) eingesetzt. B) Der Nachweis der Gag- und Env-Proteine erfolgte mit α-PFV Gag936 (1:1000) und α-PFV Env-LP (1:200).

4.4 Biochemische Charakterisierung der zellulären Proteinexpression und Infektionsanalyse der freigesetzten Partikel basierend auf Koexpression des p3HA-Fusionskonstruktes im proviralen System

Im Gegensatz zum 4-Komponenten-Vektorsystem besteht das provirale System aus nur einem Expressionskonstrukt und führt zur Bildung replikationskompetenter Viruspartikel. Aufgrund der höheren Ähnlichkeit des proviralen Vektorsystems zur natürlichen viralen

Proteinexpression sollte der Einfluss des p3^{Gag}-Proteins auf die Infektiosität viraler Partikel auch im proviralen Kontext untersucht werden. Es sollte überprüft werden, ob die Ergebnisse des 4-Komponenten-Vektorsystems auf das provirale System übertragbar sind. Hierbei fanden das wildtypische provirale Expressionsplasmid pczHSRV2EM26 und das Protease-defiziente provirale Expressionsplasmid pczHSRV2 p68st iPR Anwendung. Zur Funktionsanalyse des PFV p3^{Gag} wurde das expressionsoptimierte Konstrukt pcoPGp3 CHA dem jeweiligen proviralen Expressionskonstrukt in 293T Zellen kotransfiziert.

4.4.1 Wildtypisches provirales System (pczHSRV2EM26)

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Wirkung des PFV p3^{Gag} auf die zelluläre Proteinexpression und die Infektionsergebnisse im wt proviralen System. Hierzu wurde das replikationskompetente Expressionsplasmid pczHSRV2EM26 mit dem expressionsoptimierten p3HA-Konstrukt in den DNA-Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15 in 293T Zellen kotransfiziert. Eine mit dem gleichen DNA-Verhältnis durchgeführte Kotransfektion des Leervektors pUC19 anstelle von p3HA mit dem proviralen Konstrukt bildete die jeweilige interne Referenz für die Untersuchung. Die Transfektion des proviralen Expressionsplasmids ohne p3HA-Konstrukt oder pUC19 diente als Referenz für das gesamte Experiment. Die alleinige Transfektion des Plasmids pUC19 diente der Negativkontrolle.

Zur Analyse der zellulären Proteinexpression wurden die Proteine, wie bereits beschrieben, aufbereitet und im Western Blot nachgewiesen. Die viralen Proteine Gag, Env und Pol wurden mit PFV-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Abbildung 4.11 zeigt die Analyse der zellulären Proteinexpression des wt proviralen Systems, kotransfiziert mit dem p3HA-Expressionsplasmid oder pUC19, anhand eines repräsentativen Western Blots. In allen Proben konnten die viralen Gag-Proteine p71^{Gag} und das Spaltprodukt p68^{Gag} detektiert werden (Abbildung 4.11 A, Spuren 1-9). Der Env-LP AK detektierte zudem das unprozessierte gp130^{Env}-Protein und die ubiquitinierte Form gp18^{LP} (Abbildung 4.11 A, Spuren 1-9). Das Pol-Vorläuferprotein p127^{Pol} und die prozessierten Untereinheiten p85^{PR/RT} und p40^{IN} konnten ebenfalls in allen Spuren nachgewiesen werden (Abbildung 4.11 B, Spuren 1-9).

Für das 4-Komponenten-Vektorsystem konnte bei Kotransfektion von p3HA-Konstrukten eine abgeschwächte Expression der viralen Proteine festgestellt werden. Für das provirale System war dieser Effekt weniger deutlich erkennbar (Abbildung 4.11, Spuren 2 zu 3; 4 zu 5; 6 zu 7; 8 zu 9). Eine geringfügig schwächere Proteinexpression der viralen Vorläuferproteine Pol und Env war in den Ansätzen der DNA-Verhältnisse 1:3, 1:7 und 1:15 feststellbar (Abbildung 4.11, Spuren 4 zu 5; 6 zu 7; 8 zu 9). Allgemein konnte aber eine verminderte Expression viraler Komponenten, infolge der Reduktion des proviralen Konstruk-

tes, verzeichnet werden. Die gleiche Tendenz wurde bereits ebenso für das 4-Komponenten-Vektorsystem beobachtet.

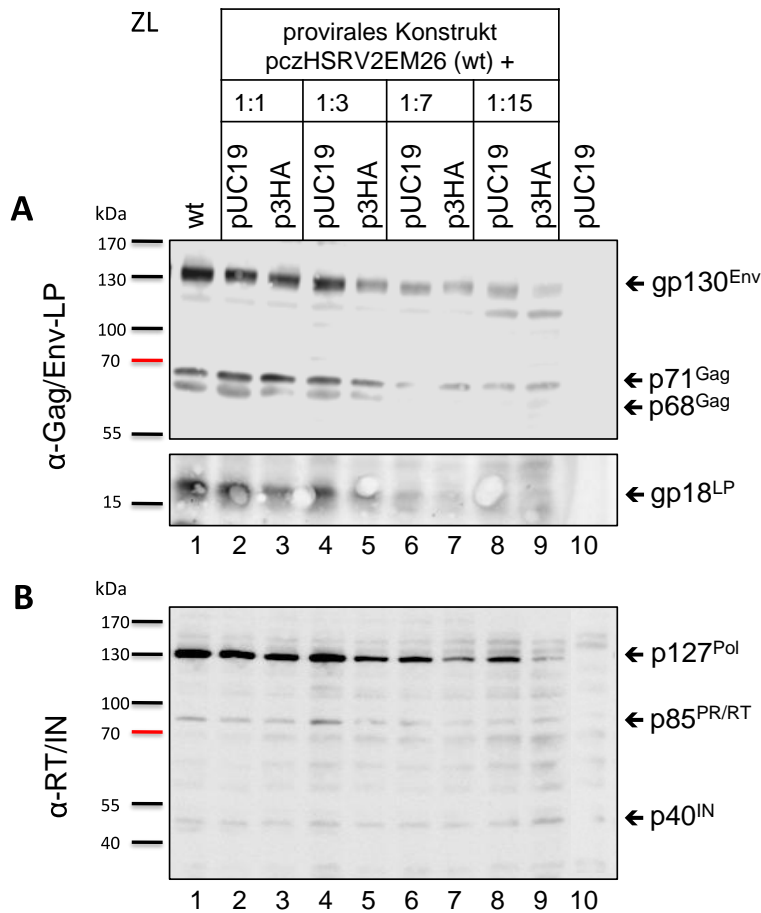


Abbildung 4.11 Biochemische Analyse der zellulären Proteinexpression basierend auf der Kotransfektion des proviralen Konstruktes pczHSRV2EM26 mit dem p3HA-Expressions-konstrukt in 293T Zellen

Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot der zellulären Expression nach Kotransfektion der PFV Expressionskonstrukte. 293T Zellen wurden zunächst mit dem proviralen Konstrukt pczHSRV2EM26 (Spur 1) transfiziert. Weiterhin wurde neben dem proviralen Expressionsplasmid das Expressionskonstrukt pcoPGp3 CHA oder als Referenz der Leervektor pUC19 kotransfiziert. Dies erfolgte in den Verhältnissen 1:1 (Spuren 2 und 3), 1:3 (Spuren 4 und 5), 1:7 (Spuren 6 und 7) und 1:15 (Spuren 8 und 9). Das Plasmid pUC19 diente als Negativkontrolle (Spur 10). Die aufbereiteten Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, wobei je 60 µl Zelllysate (ZL) auf ein 7,5 %iges Gel aufgetragen wurden. Anschließend erfolgten der Transfer der Proteine (180 mA, 90 min) und die immunologische Detektion der zellulären Proteinexpression. A) Zur Detektion der Gag- und Env-Proteine wurde α-PFV Gag936 (1:1000) und α-PFV Env-LP (1:200) eingesetzt. B) Der Nachweis der Pol-Proteine erfolgte mit α-PFV RT (1:400) und α-PFV IN (1:100).

Die Infektionsanalyse (Abbildung 4.12) der freigesetzten Partikel erfolgte, wie bereits beschrieben, mittels durchflusszytometrischer Analyse. Aus den Daten von zwei unabhängigen Experimenten wurde der Mittelwert gebildet. Der infektiöse Titer des proviralen Konstruktes pczHSRV2EM26 wurde auf 100 % gesetzt. Als Referenz zum kotransfizierten p3HA wurde das provirale Konstrukt in den Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15 zusätzlich mit dem Leervektor pUC19 kotransfiziert, wobei sich die Menge des proviralen Expressionsplasmas jeweils halbierte. Eine sinkende Infektiosität von pczHSRV2EM26

mit geringerer Transfektionsmenge konnte, mit Ausnahme des 1:1-Verhältnisses, beobachtet werden (Abbildung 4.12, schwarze Säulen). Hierbei stieg die Infektiosität geringfügig über das 100 % wt-Niveau (Abbildung 4.12, 1:1). Die Kotransfektion von p3HA schien einen leicht inhibierenden Einfluss auf die Infektiosität viraler Partikel im proviralen System zu besitzen (Abbildung 4.12, graue Säulen). Im Mittel erreichte der infektiöse Titer gegenüber den mit pUC19 kotransfizierten Proben nur rund 60 %. Der positive Einfluss des p3^{Gag}HA-Proteins auf die Infektiosität im 4-Komponenten-Vektorsystem war in diesem Fall nicht auf das provirale System übertragbar.

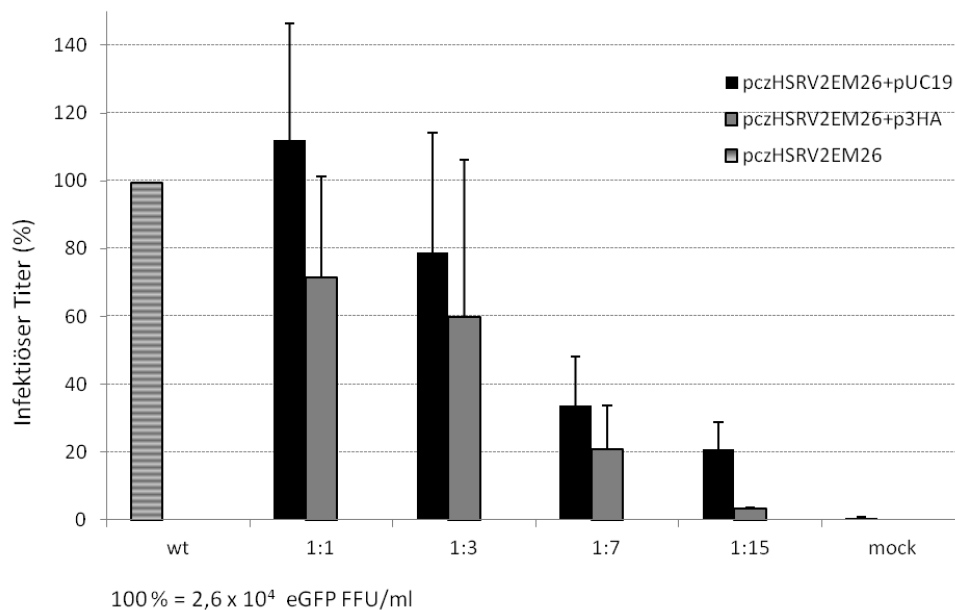


Abbildung 4.12 Relative Infektiosität der aus dem wt proviralen System mit p3HA-Konstrukten entstandenen Viruspartikel

Infektiöse Partikel entstanden nach Kotransfektion der 293T Zellen mit dem proviralen Expressionskonstrukt pczHSRV2EM26 und p3HA. Dargestellt sind die Mittelwerte der infektiösen Virustiter aus zwei Experimenten. Die Werte wurden in Bezug zum wt proviralen Expressionskonstrukt pczHSRV2EM26 berechnet, welches 100 % gesetzt wurde. Das Expressionsplasmid pcoPGp3 CHA wurde mit pczHSRV2EM26 in den Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15 kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente pUC19. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte 24 h nach Infektion der HT1080 PLNE Zellen.

4.4.2 Modifiziertes provirales System (pczHSRV2 p68st iPR)

Das provirale Expressionskonstrukt pczHSRV2p68st iPR kodiert für ein p68^{Gag}-Protein und eine inaktive Protease. Es konnte beobachtet werden, dass die Expression dieses replikationskompetenten, nicht-expressionsoptimierten Konstruktes, im Gegensatz zum äquivalenten p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystem, zu keinen infektiösen Viruspartikeln führt. Es sollte geprüft werden, ob im proviralen Kontext die Präsenz des Gag-Spaltproduktes p3^{Gag} zur Bildung infektiöser Viren beiträgt. Wie in den vorherigen Experimenten wurde dafür das provirale System mit p3HA in den Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15 in 293T Zellen kotransfiziert. Anschließend wurden HT1080 PLNE Zellen in den Ver-

dünnungsstufen 10^0 bis 10^{-3} infiziert und der infektiöse Titer durchflusszytometrisch bestimmt.

Allerdings ergab sich für keine der infizierten Zellen ein messbarer infektiöser Titer (Daten nicht gezeigt). Der Mangel an $p3^{Gag}$ scheint demnach keine Hauptursache für den Infektionsverlust der viralen Partikel, basierend auf dem proviralen Expressionskonstrukt pczHSRV2p68st iPR, zu sein.

4.5 Einfluss der Koexpression des $p68^{Gag}$ -Konstruktes im proviralen System

4.5.1 Modifiziertes provirales System (pczHSRV2 p68st iPR)

Die Transfektion des nicht-expressionsoptimierten proviralen Expressionskonstruktes pczHSRV2 p68st iPR führt im Gegensatz zum p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystem nicht zur Bildung infektiöser Partikel. Das expressionsoptimierte System zeichnet sich durch eine stärkere Proteinexpression und höhere infektiöse Titer im Kontrast zum proviralen Expressionskonstrukt aus. Sollte eine zu geringe $p68^{Gag}$ -Proteinexpression ursächlich für den Infektionsverlust des proviralen Systems sein, führt die Kotransfektion des expressionsoptimierten p68-Konstruktes (pcoPG4 1-621), welches für $p68^{Gag}$ kodiert, mit dem proviralen Konstrukt zur Bildung infektiöser Viruspartikel. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurde das provirale System mit dem p68-Konstrukt in den DNA-Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15 in 293T Zellen kotransfiziert. Nach Infektion von HT1080 PLNE Zellen konnte jedoch auch unter diesen Bedingungen keine Infektiosität festgestellt werden.

4.5.2 Wildtypisches provirales System (pczHSRV2EM26)

Da im proviralen p68st iPR System die Kotransfektion des p68-Konstruktes nicht zur Bildung infektiöser viraler Partikel führte, sollte die Wirkung des p68-Konstruktes im wildtypischen proviralen System untersucht werden. Die Vermutung einer zu geringen $p68^{Gag}$ -Proteinexpression im proviralen Kontext sollte bei Kotransfektion des p68-Konstruktes mit dem wt proviralen System eine Steigerung des infektiösen Titers bewirken. Es erfolgte die Kotransfektion des p68-Konstruktes in 293T Zellen in den bereits beschriebenen DNA-Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15. Eine mit dem gleichen DNA-Verhältnis durchgeführte Kotransfektion des Leervektors pUC19 anstelle des p68-Expressionsplasmids mit dem proviralen Konstrukt bildete die jeweilige interne Referenz für die Untersuchung. Die Transfektion des proviralen Expressionsplasmids ohne p68-Konstrukte oder pUC19 dien-

te als Referenz für das gesamte Experiment. Die alleinige Transfektion des Plasmids pUC19 diene als Negativkontrolle.

Die Analyse der zellulären Proteinexpression erfolgte durch einen immunologischen Nachweis der viralen Proteine Gag, Env und Pol. Abbildung 4.13 zeigt die Analyse der zellulären Proteinexpression für das wt provirale System, kotransfiziert mit p68-Konstrukten oder pUC19, anhand eines repräsentativen Western Blots.

Beim Nachweis der Gag-Proteine konnte für die Proben mit kotransfizierten p68-Konstrukten ein sehr starkes Expressionssignal der p68^{Gag}-Bande gegenüber der p71^{Gag}-Vorläuferbande detektiert werden (Abbildung 4.13 A, Spuren 2 zu 3; 4 zu 5; 6 zu 7; 8 zu 9). Trotz sich verdoppelnder Transfektionsmenge innerhalb der Verhältnisse 1:1 bis 1:15 des p68^{Gag}-Konstruktes, lag die p68^{Gag}-Bande in etwa äquimolaren Mengen im Western Blot vor (Abbildung 4.13 A, Spuren 3, 5, 7, 9). Proben die mit dem proviralen System und pUC19 kotransfiziert wurden, zeigten die Expression von p71^{Gag} und p68^{Gag} zu etwa gleichen Teilen (Abbildung 4.13 A, Spuren 2, 4, 6, 8).

Der Env-LP AK detektierte das unprozessierte gp130^{Env}-Protein (Abbildung 4.13 A, Spuren 1-9). Das p127^{Pol}-Vorläuferprotein und die prozessierten Untereinheiten p85^{PR/RT} und p40^{IN} konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 4.13 B, Spuren 1-9). Der Nachweis der GAPDH-Expression bestätigte das Auftragen gleicher Volumina für die einzelnen Proben (Abbildung 4.13 C, Spuren 1-10).

Für das provirale System konnte bei Kotransfektion von p3HA-Konstrukten eine geringfügig abgeschwächte Expression der viralen Proteine festgestellt werden. Bei Zugabe von p68-Konstrukten, anstelle von p3HA-Konstrukten, trat dieser Effekt ebenfalls auf (Abbildung 4.13, Spuren 2 zu 3; 4 zu 5; 6 zu 7; 8 zu 9). Eine geringfügig schwächere Proteinexpression der viralen Vorläuferproteine Pol und Env war in den Ansätzen der DNA-Verhältnisse 1:3 und 1:7 feststellbar (Abbildung 4.13, Spuren 4 zu 5; 6 zu 7).

Allgemein war ein abnehmender Gradient der viralen Proteinexpression, aufgrund der reduzierten Menge des eingesetzten proviralen Expressionskonstruktes, feststellbar (Abbildung 4.13 A und B, Spuren 1-9). Beispielsweise war für Spuren 8 und 9, die nur 1/16 der proviralen DNA-Menge von Probe 1 enthielten, keine Expression von gp130^{Env} und p71^{Gag} sichtbar (Abbildung 4.13 A und B, Spuren 1, 8 ,9).

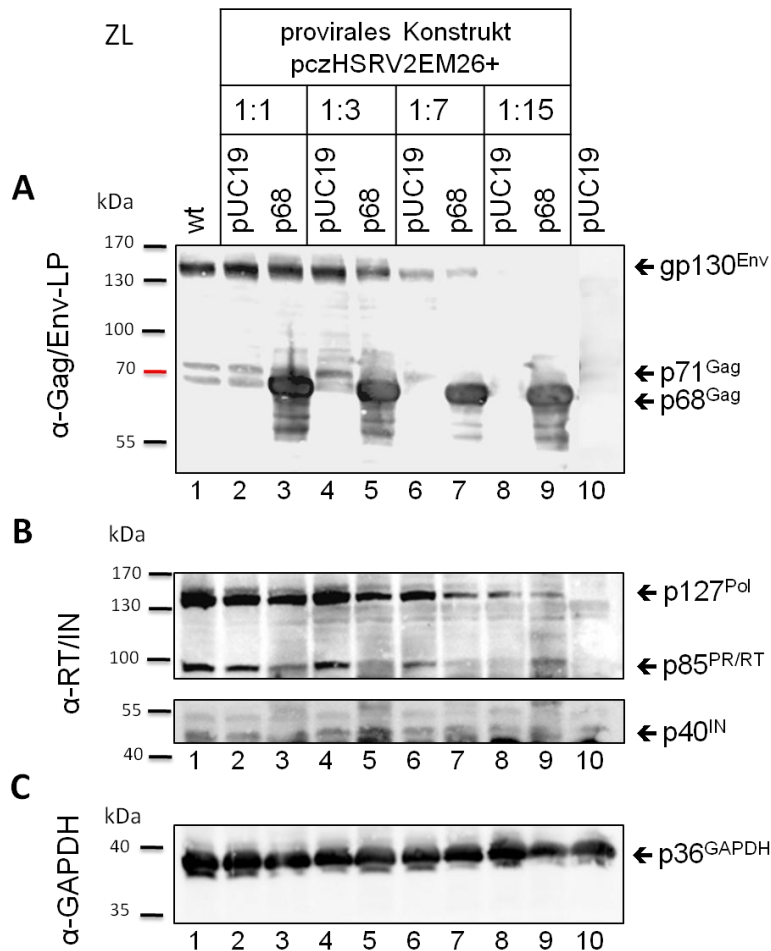


Abbildung 4.13 Biochemische Analyse der zellulären Proteinexpression basierend auf der Kotransfektion des proviralen Expressionskonstruktes pczHSRV2EM26 mit dem p68^{Gag}-Expressionskonstrukt in 293T Zellen

Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot der zellulären Expression nach Kotransfektion der PFV Expressionskonstrukte. 293T Zellen wurden einerseits mit dem proviralen Expressionskonstrukt pczHSRV2EM26 (Spur 1) transfiziert. Andererseits wurde neben proviralem Konstrukt das p68^{Gag} Expressionskonstrukt pcoPG 1-621 oder als interne Referenz der Leervektor pUC19 kotransfiziert. Dies erfolgte in den Verhältnissen 1:1 (Spuren 2 und 3), 1:3 (Spuren 4 und 5), 1:7 (Spuren 6 und 7) und 1:15 (Spuren 8 und 9). Das Plasmid pUC19 diente als Negativkontrolle (Spur 10). Die aufbereiteten Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, wobei je 60 µl Zelllysate (ZL) auf ein 7,5 %iges Gel aufgetragen wurden. Anschließend erfolgten der Transfer der Proteine (180 mA, 90 min) und die immunologische Detektion der zellulären Proteinexpression. A) Zur Detektion der Gag- und Env-Proteine wurden die AK α-PFV Gag936 (1:1000) und α-PFV Env-LP (1:200) eingesetzt. B) Der Nachweis der Pol-Proteine erfolgte mit α-PFV RT (1:400) und α-PFV IN (1:100). C) Der Nachweis der zellulären Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase mit α-GAPDH (1:50000) diente als Ladekontrolle.

Die Infektionsanalyse der freigesetzten Partikel erfolgte nach Infektion der HT1080 PLNE Zellen mit virushaltigen Zellkulturüberständen in den Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-3} . Die Infektionsrate wurde 24 h nach der Infektion mittels durchflusszytometrischer Messung bestimmt. Das Experiment wurde bislang einmal durchgeführt. Die Infektionsdaten sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Die Infektiosität der aus dem proviralen System hervorgegangenen Partikel wurde auf 100 % gesetzt. Die Transfektionsmenge des proviralen Konstruktes halbiert sich in jedem Schritt. Erwartungsgemäß wurde eine sinkende Infektiosität des proviralen Konstruktes mit geringerer Transfektionsmenge verzeichnet (Abbildung 4.14,

schwarze Säulen).

Die Kotransfektion des p68-Konstruktes mit dem wt proviralen System zeigte in allen Verhältnissen einen stark negativen Einfluss auf die Infektiosität. Ausschließlich das DNA-Verhältnis 1:1 zeigte einen messbaren infektiösen Titer von 1 % (Abbildung 4.14, schwarze Säulen). Eine steigende Menge des transfizierten p68-Konstruktes bewirkte eine vollständige Inhibierung der Infektiosität.

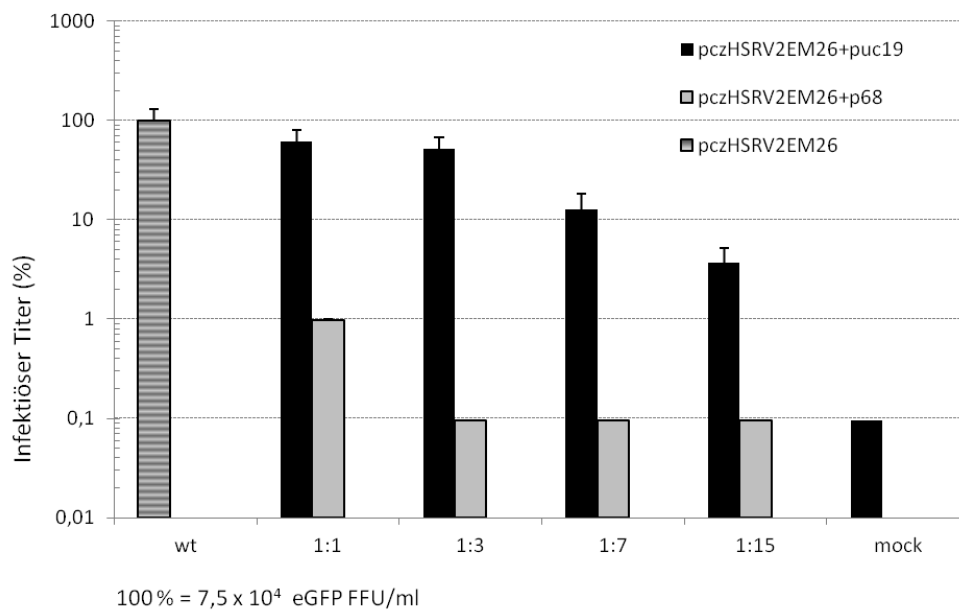


Abbildung 4.14 Relative Infektiosität der aus dem wt proviralen System mit p68^{Gag}-Konstrukten entstandenen Viruspartikel

Infektiöse Partikel entstanden nach Transfektion der 293T Zellen mit dem proviralen Expressionskonstrukt pczHSRV2EM26. Dargestellt sind die relativen infektiösen Virustiter. Die Werte wurden in Bezug zum proviralen Konstrukt pczHSRV2EM26 berechnet, welches 100 % gesetzt wurde. Das Expressionsplasmid pcoPG4 1-621 wurde mit pczHSRV2EM26 in den Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:7 und 1:15 kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente pUC19. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte 24 h nach Infektion der HT1080 PLNE Zellen.

5. DISKUSSION

Der foamyvirale Replikationszyklus unterscheidet sich in einigen Punkten von dem anderer Retroviren. Nach Prozessierung des separat translatierten Pol-Vorläuferproteins bleibt die PR- mit der RT-Untereinheit kovalent verbunden und die IN-Untereinheit spaltet sich ab. Die orthoretrovirale PR ist hingegen als autonome Untereinheit vorhanden (Yu et al., 1996). Durch die enzymatische RT-Aktivität wird bei FV während oder kurz nach der Kapsidmorphogenese die intrapartikuläre virale RNA in dsDNA umgeschrieben und durch die IN-Aktivität stabil in das Wirtsgenom der infizierten Zelle integriert (Juretzek et al., 2004; Trobridge et al., 2006).

Gegensätzlich zu Orthoretroviren, bei denen eine Spaltung des Gag-Proteins in die Untereinheiten MA, CA und NC stattfindet, weisen FV nur eine C-terminale Prozessierung des Gag-Vorläuferproteins in die beiden Untereinheiten p68^{Gag} und p3^{Gag} auf (Flügel und Pfrepper, 2003; Giron et al., 1997; Linial, 1999). Die FV Gag-Prozessierung ist essentiell für die virale Infektiosität. Die Spaltung des FV p71^{Gag}-Vorläuferproteins erfolgt PR-vermittelt zu einem späten Zeitpunkt der foamyviralen Replikation. Es wird angenommen, dass die proteolytische Aktivität der Protease ebenfalls beim Zerfall des Kapsids nach Eintritt in die Wirtszelle für eine produktive Infektion essentiell ist, indem diese eine weitere Prozessierung der Gag-Moleküle durch Erkennung sekundärer Spaltstellen bewirkt (Lehmann-Che et al., 2005).

Neuste Beobachtungen zeigten hingegen, dass, nicht wie bisher angenommen, die PR-Aktivität des PFV Pol-Proteins unerlässlich für den Eintritt des Kapsids in die Wirtszelle ist (Hütter et al., unveröffentlicht). Im expressionsoptimierten PFV 4-Komponenten-Vektorsystem konnten Hütter et al. zeigen, dass prozessierte p68^{Gag}-Konstrukte kotransfiziert mit Pol-Verpackungskonstrukten, die eine inaktivierte PR-Domäne besitzen, zur Bildung infektiöser Partikel führen (Hütter et al., unveröffentlicht). Die für die Infektiosität essentielle PR-vermittelte Gag-Prozessierung während der Partikelmorphogenese wurde dadurch vorweggenommen. Die gebildeten virale Partikel enthielten ein infektiöses DNA-Genom. Allerdings wiesen die Viruspartikel auch einen stark, etwa 100-fach, reduzierten infektiösen Titer auf. Die Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass vermutlich die Gag-Vorläufer-Prozessierung die reverse Transkription des viralen RNA-Genoms zu DNA initiiert. Weiterhin zeigten die Daten, dass eine postulierte, weitere Prozessierung des Kapsids während des Eindringens in die Wirtszelle nicht essentiell für eine produktive Infektion ist. Es wird angenommen, dass das unprozessierte Gag-Vorläuferprotein p71^{Gag} inhibitorisch auf die RT-Aktivität wirkt. FV Partikel die nur aus p68^{Gag}-Kapsiden bestehen und eine aktive PR-Domäne besitzen, weisen im Vergleich zu wildtypischen, viralen Partikeln einen reduzierten DNA-Gehalt

sowie einen 10-fach reduzierten, infektiösen Titer auf (Hütter et al., unveröffentlicht). Aufgrund dieser Beobachtungen kann spekuliert werden, dass das abgespaltene, reife p3^{Gag}-Protein einen positiven Effekt auf die reverse Transkription ausübt, was die reduzierte Infektiosität von reinen p68^{Gag} Partikeln erklären würde. Ziel der Masterarbeit war die Untersuchung des Einflusses des p3^{Gag}-Proteins auf die Infektiosität sowohl im PFV 4-Komponenten-Vektorsystem als auch im proviralen Expressionssystem.

In den Experimenten wurde zunächst auf die Untersuchung der RT-Aktivität verzichtet, da in den Analysen von Hütter et al. die Infektiosität stets mit dem DNA-Gehalt der viralen Partikel gut korrelierte.

Infektionsanalyse freigesetzter Partikel basierend auf Koexpression von p3^{Gag}-Konstrukten im PFV 4-Komponenten-Vektorsystem

Zunächst wurde im PFV 4-Komponenten-Vektorsystem der Einfluss des p3^{Gag}-Proteins auf die zelluläre Proteinexpression und die Infektiosität gebildeter Partikel charakterisiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Kotransfektion eines HA-getaggten PFV Gag p3 (p3HA)-Verpackungskonstruktes in den DNA-Verhältnissen 1:1 und 1:3 eine deutliche Steigerung der Infektiosität der gebildeten Viren bewirkte. Erfolgte die Transfektion höherer Mengen an p3^{Gag}-Fusionskonstrukten konnte teilweise eine Infektionsabnahme verzeichnet werden. In den Ansätzen 1:7 und 1:15 werden nur 2 bzw. 1 µg DNA der Plasmide des 4-Komponenten-Vektorsystems anstelle der üblichen 16 µg transfiziert. Möglicherweise ist für eine effiziente Bildung infektiöser Partikel die DNA-Menge zu gering, sodass die Expressionsstärke viraler Proteine zu niedrig ist.

Die Untersuchungen im wt-4-Komponenten-Vektorsystem lieferten einen ersten Überblick zum Einfluss des p3^{Gag}-Proteins. Es konnte eine maximal 2-fache Steigerung des infektiösen Titers beobachtet werden (Abbildung 4.3). Die für die Fragestellung weitaus interessanteren 4-Komponenten-Vektorsysteme stellten das p68- und p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystem dar. Es sollte geprüft werden, ob das Fehlen des p3^{Gag}-Konstruktes in diesen Systemen die Hauptursache für die Infektionsminderung darstellt. Der 10-fach verminderte infektiöse Titer des p68-4-Komponenten-Vektorsystems konnte in Anwesenheit von p3^{Gag} auf eine nur 2-fach reduzierte Infektiosität gegenüber dem Ausgangssystem wt reduziert werden (Abbildung 4.8). Das Vorhandensein des p3^{Gag}-Spaltproduktes scheint nicht auszureichen, um den Effekt der Infektionsminderung, der auf p68^{Gag} basierenden Viren, vollkommen umzukehren. Die Präsenz des p3^{Gag} Proteins führte zwar zur Infektiositätssteigerung, stellt aber nicht den alleinigen Grund dar. Eine potenzielle Ursache der reduzierten Infektiosität kann eine nicht ideale Expressionsmenge des p3^{Gag}-Proteins sein. Denkbar ist außerdem, dass die Fusion des C-terminalen *ha*-ORFs an das p3^{Gag}-Konstrukt eine veränderte, intramolekulare Wechselwirkung und Faltung des Prote-

ins hervorruft, die zu einer Wirkungsbeeinträchtigung führen könnte. Des Weiteren ist nicht sichergestellt, ob und in welcher Konzentration das exprimierte p3^{Gag}-Protein seinen Wirkungsort in der Zelle erreicht. Zudem ist nicht bekannt, ob Kofaktoren notwendig sind. Möglicherweise stellen auch die nur aus p68^{Gag}-Untereinheiten bestehenden Kapside nicht die optimale Umgebung für die reverse Transkription dar.

Die Bildung infektiöser Partikel in Ansätzen des p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystems zeigt, dass die Aktivität der viralen Protease nicht unerlässlich für den Eintritt des Kapsids in die Wirtszelle und produktive Infektion ist (Hütter et al., unveröffentlicht). Durch Kotransfektion des p3HA-Konstruktes konnte die Infektiosität der hervorgegangenen Viruspartikel zwar gesteigert werden, allerdings nicht annähernd auf wt-Niveau. Der Titer bleibt etwa 100-fach reduziert, was dem Verhältnis ohne p3HA-Konstransfektion entspricht. Die Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass das Fehlen des p3^{Gag}-Proteins zum Teil für die Infektionsminderung des p68-iPR-4-Komponenten-Vektorsystems verantwortlich ist. Es müssen dennoch weitere Faktoren ursächlich für die reduzierte Infektiosität sein. Wie bereits beschrieben, können einige Parameter auch den Effekt des p3^{Gag}-Proteins beeinträchtigen.

Hingegen zeigten die Untersuchungen im iPR-4-Komponenten-Vektorsystem mit kotransfiziertem p3HA-Konstrukt erwartungsgemäß keinen infektiösen Titer. Das unprozessierte p71^{Gag} wirkt vermutlich inhibitorisch auf die RT-Aktivität, da bei Kotransfektion von p68^{Gag}-Konstrukten wiederum infektiöse Viruspartikel gebildet werden (Hütter et al., unveröffentlicht). Die intrapartikuläre Transkription der viralen RNA wird vermutlich durch die Gag-Prozessierung initiiert (Hütter et al., unveröffentlicht). Die nur aus p71^{Gag} bestehenden Kapside werden als unvollständig geschlossen sowie hufeisenförmig beschrieben und stellen damit keine geeignete Umgebung für die reverse Transkription dar (Fischer et al., 1998).

Zusammenfassend kann aufgrund der Infektionsdaten der untersuchten PFV-4-Komponenten-Vektorsysteme vermutet werden, dass die p3^{Gag}-Domäne nach Prozessierung des p71^{Gag}-Vorläuferproteins eine stimulierende Wirkung auf die reverse Transkription ausübt. Der Grund dafür ist, dass eine Koexpression von p3^{Gag} *in trans* eine Infektionszunahme bewirkte. Zur Überprüfung sollte in weiterführenden Experimenten der RNA- und DNA-Gehalt der viralen Partikel mittels quantitativer Real-Time PCR charakterisiert und auch die Partikelfreisetzung quantifiziert werden. Um statistische Aussagen über die Tendenz der Infektionszunahme treffen zu können, müssten weitere Experimente angeschlossen werden.

Vergleich der Infektiosität freigesetzter Partikel basierend auf Kotransfektion von p3HA- oder p3GFP-Fusionskonstrukten

Wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben, war ausschließlich die Detektion des p3^{Gag}eGFP-Proteins erfolgreich. Aufgrund dessen wurde neben dem p3HA-Konstrukt auch das p3GFP-Konstrukt für die Infektionsanalysen im PFV 4-Komponenten-Vektorsystem eingesetzt. Werden die Infektionsdaten der aus den unterschiedlichen p3^{Gag}-Konstrukten hervorgegangenen Viren gegenübergestellt, so kann in Ansätzen mit kotransfizierten p3GFP-Konstrukten im Durchschnitt ein 30 % geringerer infektiöser Titer im Gegensatz zu Proben mit kotransfizierten p3HA-Konstrukten verzeichnet werden. Dennoch wurde in Ansätzen mit p3GFP-Konstrukten, aufgrund der positiven Wirkung des p3^{Gag}-Proteins auf die Infektiosität, mindestens der Wert der Referenzprobe des jeweilig transfizierten DNA-Verhältnisses erreicht. Im untersuchten p68-4-Komponenten-Vektorsystem konnte sogar eine bis zu 2-fache Steigerung des infektiösen Titers beobachtet werden. Vermutlich besitzt das deutlich größere p3eGFP-Protein einen geringeren positiven Einfluss als das p3HA-Protein.

Für das C-terminal fusionierte PFV Vollelänge p71^{Gag}-eGFP-Konstrukt, das für ein eGFP-getaggtetes PFV Gag-Vorläuferprotein kodiert, konnte bereits ein eindeutig hemmender Einfluss des eGFP-Tags auf die Infektiosität gebildeter Viruspartikel nachgewiesen werden (Stirnagel et al., 2010). Im Vergleich zu den auf wt Gag-Konstrukten basierenden Viruspartikel betrug der relative infektiöse Titer der Proben mit kotransfizierten Gag-eGFP-Konstrukten nur rund 2 %. Ansätze mit p71^{Gag}-HA-Konstrukten hingegen wiesen keine drastische Infektionsminderung gegenüber dem wt auf. Aufgrund des anzunehmenden inhibierenden Einflusses des eGFP-Konstruktes auf die Infektiosität ist die Analyse der Infektionsdaten auf die Ansätze mit dem p3HA-Konstrukt fokussiert.

Biochemische Charakterisierung der zellulären Proteinexpression basierend auf der Kotransfektion des 4-Komponenten-Vektorsystems mit p3^{Gag}-Konstrukten

Die biochemische Charakterisierung der zellulären Proteinexpression der Ansätze des 4-Komponenten-Vektorsystems, kotransfiziert mit unterschiedlichen Mengen von p3^{Gag}-Fusionskonstrukten, zeigte eine verminderte Expressionsstärke viraler Proteine gegenüber der mit pUC19 kotransfizierten Referenzproben (Abbildungen 4.2, 4.4 und 4.6). Möglicherweise bewirkt die Transfektion von p3^{Gag}-Konstrukten auch eine verringerte Freisetzung viraler Partikel. Zur Prüfung dieser Vermutung kann die Proteinzusammensetzung nach Partikelpräparation analysiert werden. Die schwächere zelluläre Expression viraler Proteine der Ansätze mit p3HA-Konstrukten steht allerdings nicht in Zusammenhang mit der Infektiosität. Trotz der verzeichneten verringerten Expressionsstärke viraler Proteine

in den transfizierten Verhältnissen 1:1 und 1:3 wurde in allen Fällen ein gesteigerter infektiöser Titer festgestellt (Abbildungen 4.2, 4.4 und 4.6. 1:1-1:3).

Biochemische Analyse der Expression der p3^{Gag}HA- und p3^{Gag}eGFP-FP

Eine Problematik innerhalb der Untersuchungen des 4-Komponenten-Vektorsystems stellte der biochemische Nachweis des eingesetzten p3HA-Konstruktes dar. Die zelluläre Expression des Proteins sollte immunologisch, unter Einsatz eines HA-spezifischen Antikörpers, erfolgen. Für den Nachweis des kleinen p3^{Gag}HA-Proteins (5 kDa) wurde versucht, die Blotting-Bedingungen zu optimieren. Allerdings konnte das Fusionsprotein im Western Blot nicht nachgewiesen werden. Auch ein durchgeführter Dot Blot, bei dem die Proteine nicht der Größe nach aufgetrennt, sondern nur auf eine Membran gespottet werden, führte zu keinem positiven Nachweis (Daten nicht gezeigt).

Eine potenzielle Ursache könnte sein, dass beim Transfer das p3^{Gag}HA-Protein aufgrund seiner Größe durch die Poren der Nitrozellulosemembran auf das Filterpapier transferiert wird und dadurch keine Detektion möglich ist. Auch ist möglich, dass das Protein für die Detektion nicht in ausreichender Menge exprimiert wird und damit unter der Nachweisgrenze liegt. Zum jetzigen Zeitpunkt kann nicht geklärt werden, ob das p3HA-Protein tatsächlich exprimiert wurde. Allerdings ist der positive Einfluss des kotransfizierten p3HA-Konstruktes auf die Infektionsergebnisse ein indirekter Nachweis. Weiterführend können andere Nachweismethoden zum Einsatz kommen. Beispielsweise kann die Anwendung eines ELISA-Assays sensitiver wirken.

Aufgrund der Schwierigkeit im Nachweis des p3^{Gag}HA-Proteins wurde ein zweites p3^{Gag}-Fusionskonstrukt mit einem C-terminal fusionierten *egfp*-ORF generiert. Im Gegensatz zu p3^{Gag}HA besitzt das Protein ein Molekulargewicht von 31 kDa. Bei der biochemischen Analyse konnte das p3^{Gag}eGFP-Protein durch Einsatz eGFP-spezifischer AK im Zelllysat transfizierter Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.9). Um zu klären, ob das Protein Partikel-assoziiert vorliegt, wurde das p3^{Gag}eGFP-Protein ebenfalls in den Ansätzen der Partikelpräparation immunologisch detektiert. Hierbei führte die Beobachtung, dass die alleinige Transfektion der Konstrukte PFV p3eGFP oder peGFP ebenfalls in einem nachweisbaren Signal in der Partikelpräparation resultierten, zu der Schlussfolgerung, dass die Proteine unkonventionell aus den Zellen freigesetzt und ähnlich wie Viruspartikel pelletiert werden können (Abbildung 4.9). Die meisten sekretorischen Proteine werden durch den ER-Golgi Weg zur Plasmamembran oder in den extrazellulären Raum transportiert. Sekretorische Proteine ohne internes Signalpeptid können über sogenannte unkonventionelle Protein-Sekretionswege, die nicht den ER-Golgi Exportweg benutzen, transportiert werden (Nickel, 2010). Die Details dieser unkonventionellen sekretorischen Mechanismen und warum zytoplasmatische sekretorische Proteine den unkonventionellen Sekretionsweg anstelle des klassischen Wegs bevorzugen, sind noch nicht verstanden. Vier ver-

schiedene Sekretionswege haben sich bisher als entscheidend für die unkonventionelle Proteinsekretion herausgestellt (Nickel und Rabouille, 2009).

Durch die Feststellung, dass PFV p3^{Gag}eGFP scheinbar auch unspezifisch von den Zellen freigesetzt wird, sollte die Partikelassoziation durch einen Subtilisinverdau geklärt werden. Dazu wurden die durch Transfektion und Infektion gewonnenen Virionen einer Subtilisinbehandlung unterzogen. Die Serinprotease prozessiert extrazelluläre Proteine, die nicht durch die Membran der Viruspartikel geschützt sind. Nach dem Verdau konnten die unspezifisch freigesetzten eGFP- und p3^{Gag}eGFP-Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 4.10). Somit kann keine Aussage getroffen werden, ob das PFV p3^{Gag}eGFP-Protein Partikel-assoziiert vorliegt oder ob es ausschließlich unspezifisch freigesetzt wird. Da die sekretierten Proteine eGFP und das p3^{Gag}eGFP trotz Verdau detektiert wurden, kann spekuliert werden, ob diese membranumhüllt vorliegen und somit vor einem Subtilisinverdau geschützt sind. Falls die p3^{Gag}eGFP-Proteine membranumhüllt vorliegen, ist zur Analyse der Partikelassoziation anstelle der Partikelpräparation über Ultrazentrifugation mit einem 20 %igen Sucrosekissen, die Nutzung einer anderen Aufreinigungsmethode notwendig. Eine Möglichkeit der Aufreinigung der PFV Partikelpräparation stellt die Nutzung von „magnetic beads“ dar. Die Grundlage bietet dabei eine Histidin (His) fusionierte Env-Oberflächenuntereinheit. Die Viren, die das His-Protein zugänglich auf ihrer Oberfläche tragen, können durch His-spezifische AK, die an magnetische Kügelchen gekoppelt sind, im magnetischen Feld zurückgehalten werden. Membranumhüllte p3^{Gag}eGFP-Proteine sollten nicht binden können.

Infektionsanalyse freigesetzter Partikel basierend auf Koexpression des p3HA- oder p68^{Gag}-Konstruktes im proviralen System

Neben dem 4-Komponenten-Vektorsystem sollte der Einfluss von p3^{Gag} auf die Infektiosität im proviralen, replikationskompetenten System charakterisiert werden. Die Übertragung der Kombination aus inaktivierten-Protease- und p68^{Gag}-Mutante auf ein provirales System resultierte aus bislang ungeklärten Gründen in nicht-infektiösen Viruspartikeln (Hütter et al., unveröffentlicht). Zunächst wurde vermutet, dass das Fehlen des reifen p3^{Gag}-Spaltproduktes ursächlich für den Infektionsverlust sein könnte. Da allerdings die Kotransfektion des p3HA-Konstruktes auch nicht zur Bildung infektiöser Partikel führte, konnte das Fehlen des p3^{Gag}-Proteins als Hauptursache für diesen Phänotyp im proviralen Kontext ausgeschlossen werden (Kapitel 4.4.1). Aufgrund dessen wurde eine weitere Annahme angestellt. Es sollte die Möglichkeit überprüft werden, ob im proviralen System die p68^{Gag}-Expression des Konstruktes zu gering für die Bildung infektiöser Viren ist. Die Annahme wurde aufgrund der deutlich geringeren Expressionsstärke des proviralen Konstruktes im Gegensatz zum 4-Komponenten-Vektorsystem angestellt. Zur Klärung des

Sachverhaltes erfolgte die Kotransfektion des expressionsoptimierten p68^{Gag}-Konstruktes des 4-Komponenten-Vektorsystems zu dem proviralen Expressionskonstrukt p68st iPR. Allerdings resultierte der Ansatz erneut nur in nicht-infektiösen Viren (Kapitel 4.5.1). Ein Unterschied des proviralen Systems zum 4-Komponenten-Vektorsystem ist die zusätzliche Expression der akzessorischen Proteine Bet und Tas. Beide Proteine werden als frühe Genprodukte durch Aktivität des internen Promotors gebildet und werden nicht in freigesetzte Partikel eingelagert. Das Tas-Protein wirkt als transkriptionaler Transaktivator regulatorisch auf die Genexpression. Das Bet-Protein übernimmt Funktionen auf immunmodulatorischer Ebene. Möglicherweise sind die akzessorischen Proteine für den Infektionsverlust des p68st iPR proviralen Systems von Bedeutung.

Aufgrund der nicht-infektiösen, auf dem p68st iPR proviralen System beruhenden Viruspartikel wurde der Einfluss der Konstrukte p3HA und p68 im wildtypischen proviralen System charakterisiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Kotransfektion der expressionsoptimierten Konstrukte für beide Ansätze einen negativen Einfluss auf die Infektiosität der hervorgegangen Viren besaß (Abbildungen 4.12 und 4.14). Besonders drastisch trat der Effekt bei Anwendung der p68-Konstrukte auf. Hütter et al. beschrieben bereits ebenso im 4-Komponenten-Vektorsystem, dass die Zugabe von p68-Konstrukten zur Reduktion der Infektiosität führte (Hütter et al., unveröffentlicht).

Der ungleiche Einfluss des p3^{Gag}-Proteins auf die Infektiosität ist möglicherweise den Unterschieden der Expressionssysteme geschuldet. Das 4-Komponenten-Vektorsystem dient als gutes Modellsystem um Modifikationen in einzelnen Proteinen und die Auswirkungen auf die Viruszusammensetzung zu überprüfen. Das provirale System zeichnet sich, im Unterschied zum expressionsoptimierten 4-Komponenten-Vektorsystem durch eine virusähnlichere Expressionsstärke der einzelnen viralen Proteine aus. Allerdings können Veränderungen im proviralen System auch andere Viruskomponenten beeinträchtigen, da die Expression der gesamten viralen Proteine von einem Expressionsplasmid ausgeht.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Foamyviren (FV) unterscheiden sich in ihrem Replikationszyklus von anderen Vertretern der Retroviren. Ein besonderes Merkmal stellt dabei die separate Translation des PV Pol-Vorläuferproteins dar. Das Pol-Protein vereinigt alle enzymatischen Einheiten, die Protease (PR), die Reverse Transkriptase (RT) und die Integrase (IN). Die RT vermittelt die Umschreibung der viralen RNA in dsDNA, die daraufhin durch die IN-Aktivität in das Wirtsgenom stabil integriert wird. Durch die Aktivität der Protease erfolgt während oder kurz nach der Knospung der viralen Partikel die Spaltung des Kapsid-Vorläuferproteins p71^{Gag} in die beiden Untereinheiten p68^{Gag} und p3^{Gag}. Neuste unveröffentlichte Beobachtungen von Hütter et al. zeigen, dass im Gegensatz zu bisherigen Annahmen die PR-Aktivität des PFV Pol-Proteins nicht unerlässlich für den Eintritt des Kapsids in die Wirtszelle ist. Die aus dem 4-Komponenten-Vektorsystem mit inaktiver PR-Domäne hervorgegangen Viruspartikel waren allerdings nur bei Kotransfektion mit Verpackungskonstrukten für das prozessierte p68^{Gag} infektiös. Die geringere Infektiosität dieser Partikel korrelierte mit einer verminderten Effizienz der intrapartikulären reversen Transkription. Die Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass vermutlich die Gag-Prozessierung die reverse Transkription des viralen RNA-Genoms zu DNA initiiert. Virale Partikel mit enzymatisch aktiver PR, deren Kapside lediglich auf p68^{Gag}-Konstrukten basieren, weisen im Vergleich zum Wildtyp einen 10-fach reduzierten infektiösen Titer sowie eine verminderte reverse Transkription auf. Es kann spekuliert werden, dass das abgespaltene p3^{Gag}-Protein einen positiven Effekt auf die RT-Aktivität ausübt und folglich bei Zugabe *in trans* den Rückgang der Infektiosität dieser Partikel aufheben könnte.

Für die Charakterisierung eines möglicherweise stimulatorischen Einflusses des p3^{Gag}-Proteins auf die Infektiosität gebildeter Viruspartikel wurden die Expressionskonstrukte PFV Gag p3HA und p3GFP generiert, die für das PFV p3^{Gag}-Fusionsprotein kodieren. Der biochemische Nachweis des p3^{Gag}eGFP-Proteins im Zelllysate transfizierter Zellen war erfolgreich. Jedoch konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden, ob es Partikel-assoziiert vorliegt.

In den untersuchten 4-Komponenten-Vektorsystemen führte die Kotransfektion von PFV Gag p3HA-Konstrukten zur Steigerung des infektiösen Titers. Der durch den Einsatz verringelter Mengen des 4-Komponenten-Vektorsystems begründete, reduzierte infektiöse Titer konnte in jedem Fall aufgehoben und die Ausgangsinfektiosität wiederhergestellt werden. Der gegenüber dem Wildtyp 10-fach verminderte infektiöse Titer des p68-4-Komponenten-Vektorsystems konnte durch Präsenz des p3^{Gag}-Proteins auf eine 2-fache Minderung reduziert werden. Das Fehlen des p3^{Gag}-Proteins in der p68-Mutante scheint folglich eine Ursache des Infektionsabfalls zu sein. Die beobachtete Infektionszunahme

lässt auch eine stimulierende Wirkung auf die RT-Aktivität vermuten. Der positive Einfluss des p3^{Gag}-Proteins auf die Infektionsereignisse im 4-Komponenten-Vektorsystem lies sich allerdings nicht auf das virusähnlichere provirale System übertragen. Die verzeichnete inhibierende Wirkung kann den unterschiedlichen Expressionssystemen geschuldet sein. Die Übertragung der Kombination aus inaktiver-Protease- und p68^{Gag}-Mutante auf ein provirales System resultierte aus bislang ungeklärten Gründen ebenfalls in nicht-infektiösen Viruspartikeln (Hütter et al., unveröffentlicht). Allerdings scheint weder das Fehlen des p3^{Gag}-Proteins, noch ein zu geringes Expressionslevel des p68^{Gag}-Proteins ursächlich für diesen Infektionsverlust zu sein.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Achong, B.G., Mansell, P.W.A., Epstein, M.A., Clifford, P. 1971. An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 46, 299-307.
- An, D.G., Hyun, U., Shin, C.G. 2008. Characterization of nuclear localization signals of the prototype foamy virus integrase. *J Gen Virol.* 89, 1680-1684.
- Baldwin, D.N., Linial, M.L. 1998. The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human foamy virus. *J Virol.* 72, 3658-3665.
- Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature.* 226, 1209-1211.
- Bock, M., Heinkelein, M., Lindemann, D., Rethwilm, A. 1998. Cells expressing the human foamy virus (HFV) accessory Bet protein are resistant to productive HFV superinfection. *Virology.* 250, 194-204.
- Bodem, J., Schied, T., Gabriel, R., Rammling, M., Rethwilm, A. 2011. Foamy virus nuclear RNA export is distinct from that of other retroviruses. *J Virol.* 85, 2333-2341.
- Boothe, A.D., Maaten, M.J.v.d., Malmquist, W.A. 1970. Morphological variation of a syncytial virus from lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Arch. ges. Virusforsch.* 31, 373-384.
- Cartellieri, M., Herchenröder, O., Rudolph, W., Heinkelein, M., Lindemann, D., Zentgraf, H., Rethwilm, A. 2005a. N-terminal gag domain required for foamy virus particle assembly and export. *J Virol.* 79, 12464-12476.
- Cartellieri, M., Rudolph, W., Herchenröder, O., Lindemann, D., Rethwilm, A. 2005b. Determination of the relative amounts of Gag and Pol proteins in foamy virus particles. *Retrovirology.* 2, 44.
- Coffin, J.M., Hughes, S.A., Varmus, H. 1997. *Retroviruses.* 1st Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press. U.S.
- Delelis, O., Saib, A., Sonigo, P. 2003. Biphasic DNA synthesis in spumaviruses. *J Virol.* 77, 8141-8146.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H., Calos, M.P. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol.* 7, 379-387.
- Duda, A., Luftenegger, D., Pietschmann, T., Lindemann, D. 2006. Characterization of the prototype foamy virus envelope glycoprotein receptor-binding domain. *J Virol.* 80, 8158-8167.
- Duda, A., Stange, A., Luftenegger, D., Stanke, N., Westphal, D., Pietschmann, T., Eastman, S.W., Linial, M.L., Rethwilm, A., Lindemann, D. 2004. Prototype foamy virus envelope glycoprotein leader peptide processing is mediated by a furin-like cellular protease, but cleavage is not essential for viral infectivity. *J Virol.* 78, 13865-13870.
- Eastman, S.W., Linial, M.L. 2001. Identification of a conserved residue of foamy virus Gag required for intracellular capsid assembly. *J Virol.* 75, 6857-6864.
- Enders, J.F., Peebles, T.C. 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med.* 86, 277-286.
- Enssle, J., Fischer, N., Moebes, A., Mauer, B., Smola, U., Rethwilm, A. 1997. Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J Virol.* 71, 7312-7317.

- Erlwein, O., Bieniasz, P.D., McClure, M.O. 1998. Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors. *J Virol.* 72, 5510-5516.
- Erlwein, O., Cain, D., Fischer, N., Rethwilm, A., McClure, M.O. 1997. Identification of sites that act together to direct dimerization of human foamy virus RNA in vitro. *Virology.* 229, 251-258.
- Erlwein, O., Rethwilm, A. 1993. BEL-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus. *Virology.* 196, 256-268.
- Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Müller, J.G., Rethwilm, A. 1998. Foamy virus particle formation. *J Virol.* 72, 1610-1615.
- Flügel, R.M. 1991. Spumaviruses: a group of complex retroviruses. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 4, 739-750.
- Flügel, R.M., Pfrepper, K.I. 2003. Proteolytic processing of foamy virus Gag and Pol proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 277, 63-88.
- Geiselhart, V., Bastone, P., Kempf, T., Schnolzer, M., Löchelt, M. 2004. Furin-mediated cleavage of the feline foamy virus Env leader protein. *J Virol.* 78, 13573-13581.
- Giron, M.L., Colas, S., Wybier, J., Rozain, F., Emanoil R, R. 1997. Expression and maturation of human foamy virus Gag precursor polypeptides. *J Virol.* 71, 1635-1639.
- Giron, M.L., de The, H., Saib, A. 1998. An evolutionarily conserved splice generates a secreted env-Bet fusion protein during human foamy virus infection. *J Virol.* 72, 4906-4910.
- He, F., Blair, W.S., Fukushima, J., Cullen, B.R. 1996. The human foamy virus Bel-1 transcription factor is a sequence-specific DNA binding protein. *J Virol.* 70, 3902-3908.
- Heinkelein, M., Pietschmann, T., Jarmy, G., Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., Herchenroder, O., Rethwilm, A. 2000. Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *Embo J.* 19, 3436-3445.
- Heinkelein, M., Schmidt, M., Fischer, N., Moebes, A., Lindemann, D., Enssle, J., Rethwilm, A. 1998. Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J Virol.* 72, 6307-6314.
- Herchenröder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E.K., Murthy, K.K., Schneider, J., Mergia, A., Luciw, P.A. 1994. Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology.* 201, 187-199.
- Hill, C.L., Bieniasz, P.D., McClure, M.O. 1999. Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J Gen Virol.* 80, 2003-2009.
- ICTV (International Committee of Viruses Taxonomie). 2009. Virus Taxonomy: 2009 Release. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2007 &bhcp=1>.
- Hütter et al. Persönliche Mitteilung. Institut für Virologie, TU Dresden
- Imrich, H., Heinkelein, M., Herchenroder, O., Rethwilm, A. 2000. Primate foamy virus Pol proteins are imported into the nucleus. *J Gen Virol.* 81, 2941-2947.
- Juretzek, T., Holm, T., Gartner, K., Kanzler, S., Lindemann, D., Herchenroder, O., Picard-Maureau, M., Rammling, M., Heinkelein, M., Rethwilm, A. 2004. Foamy virus integration. *J Virol.* 78, 2472-2477.
- Kang, Y., Blair, W.S., Cullen, B.R. 1998. Identification and functional characterization of a high-affinity Bel-1 DNA binding site located in the human foamy virus internal promoter. *J Virol.* 72, 504-511.

- Konvalinka, J., Löchelt, M., Zentgraf, H., Flügel, R.M., Kräusslich, H.G. 1995. Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polyprotein. *J Virol.* 69, 7264-7268.
- Lecellier, C.H., Saib, A. 2000. Foamy viruses: between retroviruses and pararetroviruses. *Virology.* 271, 1-8.
- Lehmann-Che, J., Giron, M.L., Delelis, O., Lochelt, M., Bittoun, P., Tobaly-Tapiero, J., de The, H., Saib, A. 2005. Protease-dependent uncoating of a complex retrovirus. *J Virol.* 79, 9244-9253.
- Lehmann-Che, J., Renault, N., Giron, M.L., Roingeard, P., Clave, E., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Toubert, A., de The, H., Saib, A. 2007. Centrosomal latency of incoming foamy viruses in resting cells. *PLoS Pathog.* 3, e74.
- Levinson, A.D., Oppermann, H., Levintow, L., Varmus, H.E., Bishop, J.M. 1978. Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell.* 15, 561-572.
- Lindemann, D., Pietschmann, T., Picard-Maureau, M., Berg, A., Heinkelein, M., Thurow, J., Knaus, P., Zentgraf, H., Rethwilm, A. 2001. A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J Virol.* 75, 5762-5771.
- Lindemann, D., Rethwilm, A. 1998. Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing. *J Virol.* 72, 4088-4094.
- Lindemann, D., Rethwilm, A. 2011. Foamy virus biology and its application for vector development. *Viruses.* 3, 561-585.
- Linial, M. 2000. Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol.* 8, 284-289.
- Linial, M.L. 1999. Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol.* 73, 1747-1755.
- Lo, Y.T., Tian, T., Nadeau, P.E., Park, J., Mergia, A. 2010. The foamy virus genome remains unintegrated in the nuclei of G1/S phase-arrested cells, and integrase is critical for preintegration complex transport into the nucleus. *J Virol.* 84, 2832-2842.
- Löchelt, M. 2003. Foamy virus transactivation and gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol.* 277, 27-61.
- Löchelt, M., Aboud, M., Flügel, R.M. 1993. Increase in the basal transcriptional activity of the human foamy virus internal promoter by the homologous long terminal repeat promoter in cis. *Nucleic Acids Res.* 21, 4226-4230.
- Lüftenegger, D., Picard-Maureau, M., Stanke, N., Rethwilm, A., Lindemann, D. 2005. Analysis and function of prototype foamy virus envelope N glycosylation. *J Virol.* 79, 7664-7672.
- Mannigel, I., Stange, A., Zentgraf, H., Lindemann, D. 2007. Correct capsid assembly mediated by a conserved YXXLGL motif in prototype foamy virus Gag is essential for infectivity and reverse transcription of the viral genome. *J Virol.* 81, 3317-3326.
- Meiering, C.D., Linial, M.L. 2001. Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev.* 14, 165-176.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. 2003. *Molekulare Virologie.* 2. Auflage, Heidelberg-Berlin-Oxford. Spektrum Akademischer Verlag
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. 2010. *Molekulare Virologie.* 3. Auflage, Heidelberg-Berlin-Oxford. Spektrum Akademischer Verlag
- Moebs, A., Enssle, J., Bieniasz, P.D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M.O., Rethwilm, A. 1997. Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol.* 71, 7305-7311.

- Morozov, V.A., Copeland, T.D., Nagashima, K., Gonda, M.A., Oroszlan, S. 1997. Protein composition and morphology of human foamy virus intracellular cores and extra-cellular particles. *Virology*. 228, 307-317.
- Müllers, E., Uhlig, T., Stirnnagel, K., Fiebig, U., Zentgraf, H., Lindemann, D. 2011. Novel functions of prototype foamy virus Gag glycine- arginine-rich boxes in reverse transcription and particle morphogenesis. *J Virol*. 85, 1452-1463.
- Muranyi, W., Flügel, R.M. 1991. Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J Virol*. 65, 727-735.
- Nasimuzzaman, M., Persons, D.A. 2012. Cell Membrane-associated heparan sulfate is a receptor for prototype foamy virus in human, monkey, and rodent cells. *J Virol*. 20, 1158-1166.
- Nickel, W. 2010. Pathways of unconventional protein secretion. *Curr Opin Biotechnol*. 21, 621-626.
- Nickel, W., Rabouille, C. 2009. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10, 148-155.
- Nowrouzi, A., Dittrich, M., Klanke, C., Heinkelein, M., Rammling, M., Dandekar, T., von Kalle, C., Rethwilm, A. 2006. Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line. *J Gen Virol*. 87, 1339-1347.
- Patton, G.S., Morris, S.A., Chung, W., Bieniasz, P.D., McClure, M.O. 2005. Identification of domains in gag important for prototypic foamy virus egress. *J Virol*. 79, 6392-6399.
- Petit, C., Giron, M.L., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Real, E., Jacob, Y., Tordo, N., De The, H., Saib, A. 2003. Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J Cell Sci*. 116, 3433-3442.
- Pfrepper, K.I., Löchelt, M., Rackwitz, H.R., Schnolzer, M., Heid, H., Flügel, R.M. 1999. Molecular characterization of proteolytic processing of the Gag proteins of human spumavirus. *J Virol*. 73, 7907-7911.
- Picard-Maureau, M., Jarmy, G., Berg, A., Rethwilm, A., Lindemann, D. 2003. Foamy Virus Envelope Glycoprotein-Mediated Entry Involves a pH-Dependent Fusion Process. *J Virol*. 77, 4722-4730.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A., Lindemann, D. 1999. Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol*. 73, 2613-2621.
- Pietschmann, T., Zentgraf, H., Rethwilm, A., Lindemann, D. 2000. An evolutionarily conserved positively charged amino acid in the putative membrane-spanning domain of the foamy virus envelope protein controls fusion activity. *J Virol*. 74, 4474-4482.
- Plochmann, K., Horn, A., Gschmack, E., Armbruster, N., Krieg, J., Wiktorowicz, T., Weber, C., Stirnnagel, K., Lindemann, D., Rethwilm, A., Scheller, C. 2012. Heparan sulfate is an attachment factor for foamy virus entry. *J Virol*. 86, 10028-10035.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., Gallo, R.C. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77, 7415-7419.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P., Gardner, M.B. 1974. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*. 33, 1027-1033.

- Renault, N., Tobaly-Tapiero, J., Paris, J., Giron, M.L., Coiffic, A., Roingeard, P., Saib, A. 2011. A nuclear export signal within the structural Gag protein is required for prototype foamy virus replication. *Retrovirology*. 8, 6.
- Rethwilm, A. 2010. Molecular biology of foamy viruses. *Med Microbiol Immunol*. 199, 197-207.
- Riggs, J.L., Oshiro, L.S., Taylor, D.O.N., Lennette, E.H. 1969. Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature*. 222, 1190-1191.
- Roy, J., Rudolph, W., Juretzek, T., Gartner, K., Bock, M., Herchenroder, O., Lindemann, D., Heinkelein, M., Rethwilm, A. 2003. Feline foamy virus genome and replication strategy. *J Virol*. 77, 11324-11331.
- Saib, A., Puvion Dutilleul, F., Schmid, M., Peries, J., de The, H. 1997. Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step. *J Virol*. 71, 1155-1161.
- Schliephake, A.W., Rethwilm, A. 1994. Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *J Virol*. 68, 4946-4954.
- Sfakianos, J.N., Hunter, E. 2003. M-PMV capsid transport is mediated by Env/Gag interactions at the pericentriolar recycling endosome. *Traffic*. 4, 671-680.
- Shaw, K.L., Lindemann, D., Mulligan, M.J., Goepfert, P.A. 2003. Foamy virus envelope glycoprotein is sufficient for particle budding and release. *J Virol*. 77, 2338-2348.
- Stange, A., Luftenegger, D., Reh, J., Weissenhorn, W., Lindemann, D. 2008. Subviral particle release determinants of prototype foamy virus. *J Virol*. 82, 9858-9869.
- Stange, A., Mannigel, I., Peters, K., Heinkelein, M., Stanke, N., Cartellieri, M., Göttlinger, H., Rethwilm, A., Zentgraf, H., Lindemann, D. 2005. Characterization of prototype foamy virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. *J Virol*. 79, 5466-5476.
- Stanke, N., Stange, A., Lüftenegger, D., Zentgraf, H., Lindemann, D. 2005. Ubiquitination of the Prototype Foamy Virus Envelope Glycoprotein Leader Peptide Regulates Subviral Particle Release. *J Virol*. 79, 15074-15083.
- Stirnagel, K., Luftenegger, D., Stange, A., Swiersy, A., Mullers, E., Reh, J., Stanke, N., Grosze, A., Chiantia, S., Keller, H., Schwill, P., Hanenberg, H., Zentgraf, H., Lindemann, D. 2010. Analysis of Prototype Foamy Virus particle-host cell interaction with autofluorescent retroviral particles. *Retrovirology*. 7, 45.
- Stirnagel, K., Schupp, D., Dupont, A., Kudryavtsev, V., Reh, J., Mullers, E., Lamb, D.C., Lindemann, D. 2012. Differential pH-dependent cellular uptake pathways among foamy viruses elucidated using dual-colored fluorescent particles. *Retrovirology*. 9, 71.
- Temin, H.M., Mizutani, S. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. 226, 1211-1213.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Giron, M.L., Neves, M., Koken, M., Saib, A., de The, H., 2001. Human foamy virus capsid formation requires an interaction domain in the N terminus of Gag. *J Virol*. 75, 4367-4375.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Neves, M., Guillemain, M.C., Lecellier, C.H., Puvion-Dutilleul, F., Gicquel, B., Zientara, S., Giron, M.L., de The, H., Saib, A. 2000. Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J Virol*. 74, 4064-4073.
- Trobridge, G.D., Miller, D.G., Jacobs, M.A., Allen, J.M., Kiem, H.P., Kaul, R., Russell, D.W. 2006. Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 1498-1503.

- Vogt, P.K. 1997. Historical introduction to the general properties of retroviruses. *Retroviruses*. J. M. Coffin, S. H. Hughes and E. V. Varmus. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1. Edition, 1-26.
- Wiktorowicz, T., Peters, K., Armbruster, N., Steinert, A.F., Rethwilm, A. 2009. Generation of an improved foamy virus vector by dissection of cis-acting sequences. *J Gen Virol*. 90, 481-487.
- Wilk, T., de Haas, F., Wagner, A., Rutten, T., Fuller, S., Flügel, R.M., Löchelt, M. 2000. The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer. *J Virol*. 74, 2885-2887.
- Wilk, T., Geiselhart, V., Frech, M., Fuller, S.D., Flügel, R.M., Löchelt, M. 2001. Specific interaction of a novel foamy virus env leader protein with the n-terminal gag domain. *J Virol*. 75, 7995-8007.
- Yu, S.F., Baldwin, D.N., Gwynn, S.R., Yendapalli, S., Linial, M.L. 1996. Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science*. 271, 1579-1582.
- Yu, S.F., Eastman, S.W., Linial, M.L. 2006. Foamy virus capsid assembly occurs at a pericentriolar region through a cytoplasmic targeting/retention signal in Gag. *Traffic*. 7, 966-977.
- Yu, S.F., Sullivan, M.D., Linial, M.L. 1999. Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol*. 73, 1565-1572.
- Zamborlini, A., Renault, N., Saib, A., Delelis, O. 2010. Early reverse transcription is essential for productive foamy virus infection. *PLoS One*. 5, e11023.
- Zemba, M., Wilk, T., Rutten, T., Wagner, A., Flügel, R.M., Löchelt, M. 1998. The carboxy-terminal p3Gag domain of the human foamy virus Gag precursor is required for efficient virus infectivity. *Virology*. 247, 7-13.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die vorgelegte Masterarbeit „Einfluss des Verhältnisses von Prototype Foamy Virus (PFV) Kapsid- und Enzymkomponenten auf die Infektiosität von PFV Partikeln“ selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form weder veröffentlicht noch einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, 28.09.2012

Nora Heinig